

Elena Cristea-Popa  
Aurora Popescu  
E. Truția  
Veronica Dinu

---

# TRATAT DE BIOCHIMIE MEDICALĂ

---

VOLUMUL I  
editura medicală



III - 1 -  
223722



BIBL. CENTR. UNIV.  
„M. EMINESCU”- IASI  
77-223722







ELENA CRISTEA-POPA

Profesor dr.

VERONICA DINU

Conferențiar dr.

AURORA POPESCU

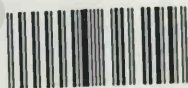
Profesor dr. doc.

E. TRUȚIA

Conferențiar dr.

# TRATAT DE BIOCHIMIE MEDICALĂ

VOL. I



332629

B.C.U. IASI



EDITURA MEDICALĂ - BUCUREȘTI, 1991



AURORA POPESCU  
Profesor dr. doc.

E. TRUȚIA  
Confertențiar dr.

Coperta de SILVIA COLFESCU

ELENA CRISTEA-POPA  
Profesor dr.

VERONICA DINU  
Confertențiar dr.

# TRATAT DE BIOCHIMIE MEDICALĂ

VOI. I

60892
B. C. SCU*
de 711.417



ISBN 973-39-0116-4

EDITURA 1991 ISBN 973-39-0114-8

## Prefață

Biochimia cunoaște în zilele noastre o dezvoltare remarcabilă, rapidă și multilaterală. În dorința de a sistematiza într-un tot unitar ansamblul cunoștințelor acumulate de biochimia modernă, autorii și-au propus să elaboreze manualul de față. La conceperea lui s-a ținut seama și de caracterul formator al biochimiei — știință aflată în continuă evoluție — precum și de faptul că ea este un îndreptar permanent care ajută la înțelegerea fenomenelor biologice (normale și patologice).

Deși caracterul lucrării de față este — în primul rînd — didactic, manualul are o largă adresabilitate, fiind destinat atît studenților de la facultățile de medicină cît și specialiștilor medici, biologi sau chimiști.

Prima parte a manualului cuprinde studiul biochimic al constituenților organismului și al principalelor căi metabolice; inclusiv, energetica și reglarea lor. Acest material este strict necesar înțelegerii noțiunilor cuprinse în partea a II-a, destinată studiului biochimiei țesuturilor și organelor. La sfîrșitul părții a II-a sînt incluse și noțiunile de biochimie a nutriției.

Pentru a ușura parcurgerea, înțelegerea și asimilarea materialului prezentat, expunerea noțiunilor — în fiecare capitol — s-a făcut de la simplu la complex, pornind de la date clasice pînă la cele mai noi achiziții ale cercetării moderne, într-o ordine cît mai logică. În redactare s-a ținut seama de nomenclatura actuală utilizată în biochimia modernă iar textul s-a însoțit, ori de cîte ori s-a socotit necesar, de materialul ilustrativ adecvat (scheme, desene, tablouri sinoptice). Din bibliografia cercetată, în manual s-au menționat numai lucrările cele mai cuprinzătoare și noi ale literaturii de specialitate, avută la dispoziție.

Dacă cei interesați în problemele biologico-medicale vor găsi în manualul de față un material documentar util, autorii pot considera că această Biochimie Medicală și-a atins scopul.

Totodată, autorii țin să mulțumească tuturor celor care au contribuit la apariția acestui manual.

**Autorii**



Biochimia cunoaște în zilele noastre o dezvoltare remarcabilă, rapidă și  
neglijabilă. În domeniul de cercetare științifică într-un tot mai mare număr de  
laboratoare de biochimie modernă, unde și-au găsit să elaboreze materialul  
de față. La conceperea lui s-a ținut seama și de caracterul formelor de biochimie  
— știință aplicată în medicină — precum și de faptul că ea este un înțeles  
permanent care ajută la înțelegerea fenomenelor fiziologice (normale și patologice).  
Deși caracterul lucrării de față este — în primul rând — didactic, materialul  
are o largă aplicabilitate, fiind destinat atât studenților de la facultățile de medi-  
cină cât și specialiștilor medicali, biologi sau chimiști.

Prima parte a manualului cuprinde studiul biochimic al constituenților  
organismului și al principalelor căi metabolice; include, însoțită și explicată  
lor. Acest material este strict necesar înțelegerei noțiunilor cuprinse în partea a  
II-a, destinată studiului biochimiei fiziologice și patologice. La sfârșitul părții  
a II-a sunt incluse și noțiunile de biochimie a nutrienților.

Partea a III-a cuprinde, însoțită și explicată materialul prezentat.  
expunerea noțiunilor — în fiecare capitol — s-a ținut de la simplu la complex,  
pornind de la date clasice pînă la cele mai noi rezultate ale cercetării moderne.  
Într-o ordine cel mai logic. În redactare s-a ținut seama de nomenclatură actuală  
utilizată în biochimia modernă iar textul s-a însoțit, ori de câte ori s-a socotit ne-  
cesar, de materialul ilustrativ adecvat (scheme, desene, tabele și sinchete). Din  
bibliografia cercetărilor, în manual s-au menționat numai lucrările care mai au  
printr-un și noi ale literaturii de specialitate, având la dispoziție.

Întrucât cel interesat în problemele fiziologice-medicale vor găsi în manualul  
de față un material documentar util, autorii pot considera că această biochimie  
Medicină și-a găsit locul.

Ținând, autorii în să mulțumesc tuturor celor care au contribuit la apa-  
rirea acestui manual.

# Cuprins

V.1.1. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.2. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.3. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.4. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.5. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.6. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.7. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.8. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.9. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.10. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.11. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.12. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.13. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.14. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.15. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.16. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.17. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.18. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.19. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.20. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.21. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.22. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.23. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.24. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.25. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.26. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.27. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.28. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.29. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.30. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.31. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.32. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.33. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.34. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.35. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.36. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.37. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.38. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.39. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.40. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.41. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.42. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.43. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.44. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.45. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.46. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.47. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.48. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.49. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.50. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.51. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.52. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.53. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.54. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.55. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.56. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.57. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.58. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.59. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.60. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.61. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.62. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.63. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.64. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.65. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.66. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.67. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.68. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.69. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.70. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.71. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.72. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.73. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.74. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.75. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.76. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.77. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.78. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.79. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.80. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.81. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.82. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.83. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.84. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.85. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.86. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.87. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.88. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.89. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.90. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.91. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.92. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.93. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.94. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.95. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.96. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.97. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.98. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.99. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
V.1.100. Varietate energetică liberă în reacțiile de oxidare-reducere	111
Prefață	3
Cap. I. Proteinele, structura generală (Prof. dr. Elena Cristea-Popa)	13
I.1. Aminoacizii	14
I.2. Peptidele	27
I.3. Proteinele	28
I.3.1. Structura primară a proteinelor	30
I.3.2. Organizarea spațială a moleculelor proteice	31
I.3.2.1. Structura secundară a proteinelor	32
I.3.2.2. Structura terțiară a proteinelor	36
I.3.2.3. Structura cuaternară a proteinelor	42
I.3.3. Proprietățile generale ale proteinelor	44
I.3.4. Clasificarea proteinelor	46
Cap. II. Enzimele (Conf. dr. E. Truția)	48
II.1. Introducere	48
II.2. Energia de activare a reacțiilor catalizate de enzime	48
II.3. Specificitatea enzimelor	50
II.4. Structura enzimelor	54
II.4.1. Enzime de natură exclusiv proteică	54
II.4.2. Enzime de natură heteroproteică	55
II.4.3. Sisteme (complexe) multienzimatice	57
II.4.4. Izoenzime	58
II.5. Centrul activ și mecanismul de acțiune al enzimelor	58
II.6. Cinetica enzimatică	63
II.6.1. Exprimarea activității enzimelor	64
II.6.2. Influența pH-ului și temperaturii asupra activității enzimelor	65
II.6.3. Influența concentrației enzimelor	66
II.6.4. Influența concentrației substratului, Ecuația Michaelis-Menten	67
II.6.5. Ecuația Lineweaver-Burk, Semnificația lui $K_m$	70
II.6.6. Inhibiția activității enzimelor	71
II.7. Reglarea cantității și eficienței catalitice a enzimelor	74
II.7.1. Aspecte generale	74
II.7.2. Reglarea cantității enzimelor	75
II.7.3. Reglarea alosterică a activității enzimelor	76
II.7.4. Reglarea covalentă a activității enzimelor	81
II.8. Localizarea intracelulară a enzimelor	82
II.9. Relația dintre enzime și patologii	84
II.10. Clasificarea și denumirea enzimelor	86



	Pag.
Cap. III. Vitamine și coenzime (Prof. dr. doc. Aurora Popescu)	88
III.1. Generalități	88
III.2. Clasificarea vitaminelor	88
III.3. Vitaminele hidrosolubile	89
III.3.1. Complexul B	89
III.3.1.1. Vitamina B <sub>1</sub> (tiamina) și coenzima tiaminpirofosfat	90
III.3.1.2. Vitamina B <sub>2</sub> (riboflavina) și coenzimele flavinice	93
III.3.1.3. Vitamina PP (niacina) și coenzimele nicotinamidice	95
III.3.1.4. Vitamina B <sub>6</sub> (piridoxina) și coenzimele derivate	99
III.3.1.5. Acidul pantotenic și coenzima A	102
III.3.1.6. Biotina și rolul ei coenzimatic	104
III.3.1.7. Vitamina B <sub>12</sub> (ciancobalamina) și rolul ei coenzimatic	107
III.3.1.8. Acidul folic și coenzimele derivate	111
III.3.2. Vitamina C (acidul ascorbic)	115
III.4. Vitaminele liposolubile	118
III.4.1. Vitamina A (retinolul)	118
III.4.2. Vitamina D	122
III.4.3. Vitamina E	126
III.4.4. Vitamina K	128
Cap. IV. Acizii nucleici (dr. Veronica Dinu)	132
IV.1. Introducere	132
IV.2. Structura chimică a acizilor nucleici	133
IV.3. Acizii dezoxiribonucleici	141
IV.3.1. Structura covalentă a ADN	141
IV.3.2. Structura secundară a ADN	143
IV.3.3. Organizarea materialului genetic la procariote și eucariote	144
IV.3.4. Arhitectura genomului eucariot	147
IV.3.5. Biosinteza ADN	149
IV.3.5.1. Replicarea la procariote	152
IV.3.5.2. Replicarea la eucariote	158
IV.4. Sinteza de ADN pe matrice de ARN	159
IV.5. Acizii ribonucleici	161
IV.5.1. ARN mesager (ARN <sub>m</sub> )	162
IV.5.2. ARN de transfer (ARN <sub>t</sub> )	163
IV.5.3. ARN ribozomal (ARN <sub>r</sub> )	165
IV.5.4. Biosinteza ARN pe matrice de ADN (Transcrierea)	167
IV.5.5. Prelucrări posttranscriere ale moleculelor de ARN	170
IV.5.6. Biosinteza ARN pe matrice de ARN	176
Cap. V. Biosinteza proteinelor (dr. Veronica Dinu)	178
V.1. Codul genetic	178
V.2. Biosinteza proteinelor	181
V.3. Reglarea biosintezei proteinelor	190
V.4. Modificări ale materialului genetic	196
V.4.1. Recombinarea genetică	196
V.4.2. Transpoziția genetică	203
V.4.3. Mutațiile	206
Cap. VI. Energetica biochimică (Conf. dr. E. Truța)	214
VI.1. Introducere	214
VI.2. Sisteme termodinamice. Funcții de stare. Principiile termodinamicii	215
VI.3. Entropia și energia liberă. Semnificația lor pentru procesele biochimice	217

	Pag.
VI.4. Variația energiei libere în reacțiile chimice și biochimice	218
VI.4.1. Variația energiei libere și constanta de echilibru. Energia liberă de reacție standard	219
VI.4.2. Variația energiei libere în reacțiile de oxido-reducere. Potențialul redox și legătura lui cu energia liberă	221
VI.5. Cuplarea reacțiilor endergonice cu cele exergonice. Intermediarul energetic comun	223
VI.6. Legături macroergice. Sistemul ATP/ADP + P <sub>i</sub> , principalul intermediar energetic comun (compus macroergic)	224
VI.7. Alți compuși macroergici. Potențialul de transfer al grupării fosfat	227
VI.8. Căile de sinteză a ATP	229
VI.8.1. Fosforilarea la nivel de substrat	230
VI.8.2. Lanțul respirator și fosforilarea oxidativă	232
VI.8.3. Teorii privind mecanismul fosforilării oxidative	238
VI.8.4. Controlul respirator	242
VI.8.5. Decuplanti ai fosforilării oxidative de lanțul respirator	243
VI.8.6. Alte lanțuri respiratorii	243
VI.8.7. Specii incomplet reduse ale oxigenului	244
Cap. VII. Metabolismul glucidelor (dr. Veronica Dinu)	246
VII.1. Chimia glucidelor	246
VII.1.1. Monozaharidele	247
VII.1.1.1. Stereozomeria monozaharidelor	247
VII.1.1.2. Structurile ciclice ale monozaharidelor	251
VII.1.1.3. Aminozaaharuri	255
VII.1.1.4. Dezoxizaaharuri	257
VII.1.1.5. Proprietățile fizice și chimice ale monozaharidelor	257
VII.1.2. Oligozaharidele	261
VII.1.3. Polizaharidele	263
VII.2. Digestia și absorbția glucidelor	266
VII.2.1. Deficite enzimatice în digestia și absorbția glucidelor	268
VII.3. Căile de metabolizare a glucozei	269
VII.3.1. Glicoliza (secvența Embden-Meyerhof-Parnas)	271
VII.3.1.1. Bilanțul energetic al glicolizei	277
VII.3.2. Decarboxilarea oxidativă a piruvatului	279
VII.3.3. Ciclul acizilor tricarboxilici (ciclul Krebs)	282
VII.3.3.1. Ciclul Krebs — cale amfibolică	287
VII.3.3.2. Bilanțul energetic al arderii glucozei	288
VII.4. Alte căi de degradare a glucozei	290
VII.4.1. Calea pentozo-fosfaților (suntul pentozo-fosfat)	290
VII.4.1.1. Deficiențe ale unor enzime implicate în calea pentozelor	296
VII.4.2. Calea acidului glucuronic	297
VII.5. Gluconeogeneza	299
VII.5.1. Reglarea alosterică a gluconeogenezei	304
VII.5.2. Reglarea hormonală a gluconeogenezei	306
VII.6. Metabolismul glicogenului	307
VII.6.1. Degradarea glicogenului (glicogenoliza)	309
VII.6.1.1. Reglarea glicogenolizei	310
VII.6.2. Biosinteza glicogenului (glicogenogeneza)	313
VII.6.2.1. Reglarea glicogenogenezei	314
VII.6.3. Alterări enzimatice în metabolismul glicogenului	316
VII.7. Metabolismul galactozei	317
VII.8. Metabolismul fructozei	320
VII.9. Glicoproteinele	321
VII.9.1. Biosinteza glicoproteinelor	322
VII.9.2. Semnificația biologică a glicoproteinelor	326
VII.10. Proteoglicanii	328



	Pag.
Cap. VIII. Metabolismul lipidelor (Prof. dr. Elena Cristea-Popa)	333
VIII.1. Chimia lipidelor	333
VIII.1.1. Acizii grași	334
VIII.1.2. Acilgliceroli (gliceridele sau grăsimile neutre)	335
VIII.1.3. Fosfogliceridele (glicerofosfolipidele, fosfatidele)	337
VIII.1.3.1. Acizii fosfatidici	338
VIII.1.3.2. Fosfatidil-colinele (lecitine)	338
VIII.1.3.3. Fosfatidil-etanolaminele (cefaline)	340
VIII.1.3.4. Fosfatidil-serinele (serin-cefaline)	340
VIII.1.3.5. Fosfatidil-inozitolii (inozitol-fosfatide)	341
VIII.1.3.6. Plasmalogerele	342
VIII.1.3.7. Fosfatidil-gliceroli	342
VIII.1.4. Sfingolipidele	342
VIII.1.4.1. Sfingomicelinele	343
VIII.1.4.2. Glicosfingolipidele	343
VIII.1.5. Cereurile	345
VIII.1.6. Lipide neaponiabile	345
VIII.1.6.1. Terpenenele	345
VIII.1.6.2. Carotenoizii	347
VIII.1.6.3. Steroizii	348
VIII.2. Digestia și absorbția lipidelor	352
VIII.3. Metabolismul acizilor grași	354
VIII.3.1. Degradarea oxidativă a acizilor grași	354
VIII.3.1.1. $\beta$ -Oxidarea acizilor grași (spirală lui Lignon)	355
VIII.3.1.2. $\beta$ -Oxidarea acizilor nesaturați	359
VIII.3.1.3. Oxidarea acizilor grași în peroxizomi	361
VIII.3.1.4. Cetogeneza	361
VIII.3.2. Biosinteza acizilor grași	364
VIII.3.2.1. Biosinteza acidului palmitic	364
VIII.3.2.2. Elongarea acizilor grași	366
VIII.3.2.3. Biosinteza acizilor grași nesaturați	368
VIII.4. Metabolismul glicerolului	369
VIII.5. Metabolismul trigliceridelor	370
VIII.5.1. Hidroliza trigliceridelor	370
VIII.5.2. Biosinteza trigliceridelor	373
VIII.6. Metabolismul glicerofosfolipidelor	376
VIII.7. Metabolismul sfingolipidelor	378
VIII.8. Metabolismul colesterolului	381
VIII.8.1. Digestia și absorbția colesterolului	382
VIII.8.2. Biosinteza colesterolului	383
VIII.8.3. Catabolismul colesterolului	386
VIII.9. Lipidele plasmactice	380
VIII.9.1. Analiza lipidelor plasmactice	389
VIII.9.2. Chilomicronii	394
VIII.9.3. Lipoproteinele cu densitate foarte mică (VLDL, pre- $\beta$ -lipoproteine)	395
VIII.9.4. Lipoproteinele cu densitate mică (LDL, $\beta$ -lipoproteine)	397
VIII.9.5. Lipoproteinele cu densitate mare (HDL, $\alpha$ -lipoproteine)	399
VIII.9.6. Acizii grași liberi (AGL, acizi grași neesterificați)	400
VIII.9.7. Dislipidemiile	400
VIII.10. Icosanoizii (prostaglandine, tromboxani, leucotriene)	404
VIII.10.1. Structură chimică	405
VIII.10.2. Biosinteza icosanoizilor	406
VIII.10.3. Catabolismul prostaglandinelor	409
VIII.10.4. Acțiunile biologice ale icosanoizilor	409
Cap. IX. Metabolismul proteinelor și al aminoacizilor (Conf. dr. E. Truția)	412
IX.1. Introducere	412
IX.2. Starea dinamică a proteinelor. Bilanțuri azotate	413
IX.3. Digestia proteinelor alimentare și absorbția aminoacizilor	414

	Pag.
IX.4. Fondul metabolic comun de aminoacizi. Aminoacizi esențiali și neesențiali	417
IX.5. Căi generale și particulare de catabolizare a aminoacizilor	418
IX.5.1. Decarboxilarea aminoacizilor; amine biogene	419
IX.5.2. Catabolismul azotului aminoacizilor. Transaminarea și dezaminarea oxidativă	421
IX.5.3. Metabolismul amoniacului. Formarea și eliminarea ureei	423
IX.5.4. Utilizarea scheletului de carbon al aminoacizilor	427
IX.6. Biosinteza aminoacizilor neesențiali	435
IX.7. Participarea aminoacizilor la sinteza unor compuși cu funcții biologice specializate	438
IX.7.1. Biosinteza glutatationului	439
IX.7.2. Metabolismul creatinei	440
IX.7.3. Compuși „conjugati” ai aminoacizilor	441
IX.8. Interrelații între metabolismul glucidelor, lipidelor și proteinelor	442
Cap. X. Metabolismul hemoproteinelor (Conf. dr. E. Truția)	447
X.1. Aspecte chimice	447
X.2. Biosinteza hemului	450
X.2.1. Reglarea biosintezei hemului	454
X.2.2. Porfiriile	455
X.3. Catabolismul hemului	459
X.4. Hiperbilirubinemiile	465
X.4.1. Hiperbilirubinemia cu bilirubină neconjugată	465
X.4.2. Hiperbilirubinemia cu bilirubină conjugată	467
X.4.3. Hiperbilirubinemia cu ambele forme de bilirubină	467
Cap. XI. Metabolismul nucleotidelor purinice și pirimidinice (Prof. dr. Elena Cristea-Popa)	469
XI.1. Metabolismul nucleotidelor purinice	469
XI.1.1. Biosinteza de novo a nucleotidelor purinice	471
XI.1.1.1. Biosinteza IMP	471
XI.1.1.2. Biosinteza AMP și GMP	476
XI.1.1.3. Biosinteza nucleotidelor cu legături fosfat macroergice	477
XI.1.1.4. Biosinteza dezoxiribonucleotidelor	477
XI.1.2. Interconversiunile și reutilizarea purinelor	480
XI.1.3. Catabolismul purinelor	484
XI.1.4. Patologia metabolismului purinelor	486
XI.2. Metabolismul nucleotidelor pirimidinice	487
XI.2.1. Biosinteza de novo a nucleotidelor pirimidinice	488
XI.2.2. Reutilizarea și catabolismul nucleotidelor pirimidinice	492
XI.2.3. Patologia metabolismului pirimidinelor	494
Cap. XII. Sistemul hormonal (Prof. dr. Elena Cristea-Popa)	495
XII.1. Generalități	495
XII.1.1. Receptorii hormonal	498
XII.1.2. Mecanisme generale de acțiune a hormonilor	500
XII.1.2.1. Mecanismul de acțiune a hormonilor liposolubili (steroidici și tiroidieni)	502
XII.1.2.2. Mecanismul de acțiune a hormonilor hidrosolubili (peptidici, catecolamine)	502
XII.2. Hormonii tiroidieni	512
XII.3. Hormonii care reglează metabolismul calciului	518
XII.3.1. Hormonul paratiroidian	519
XII.3.2. Calcitonina	521
XII.3.3. 1,25-Dihidroxi-colecalciferol	521



	Pag.
<b>XII.4. Hormonii pancreatici</b>	524
XII.4.1. Insulina	525
XII.4.2. Glucagonul	529
XII.4.3. Somatostatina	532
XII.4.4. Polipeptidul pancreatic	532
<b>XII.5. Hormonii gastrointestinali</b>	532
<b>XII.6. Hormonii medulosuprarenali</b>	533
<b>XII.7. Hormonii corticosuprarenali</b>	538
<b>XII.8. Hormonii sexuali</b>	545
XII.8.1. Androgenii	545
XII.8.2. Hormonii ovarieni	548
<b>XII.9. Hormonii hipofizari și hipotalamici</b>	550
XII.9.1. Hormonii adenohipofizari	551
XII.9.2. Hormonii neurohipofizari	557
<b>XII.10. Epifiza (glanda pineală)</b>	558
<b>XII.11. Endorfine</b>	559
<b>XII.12. Factori de creștere</b>	561
<b>Cap. XIII. Metabolismul mineral (Prof. dr. doc. Aurora Popescu)</b>	566
<b>XIII.1. Apa și procesele hidroelectrolitice din organism</b>	566
XIII.1.1. Repartiția apei în organism	568
XIII.1.2. Proprietățile fizico-chimice ale apei	571
XIII.1.2.1. Punctul de topire și punctul de fierbere	571
XIII.1.2.2. Căldura specifică și căldura de vaporizare	572
XIII.1.2.3. Polaritatea moleculei de apă	472
XIII.1.2.4. Apa ca dizolvant	573
XIII.1.3. Rolurile apei în organism	574
XIII.1.4. Echilibrul apei în organism	574
XIII.1.4.1. Pierderile de apă	575
XIII.1.4.2. Necesarul zilnic de apă	576
XIII.1.4.3. Excesul de apă	576
XIII.1.5. Procesele hidroelectrolitice	577
XIII.1.5.1. Ionizarea apei și produsul ionic al apei	577
XIII.1.5.2. Reacția soluțiilor și unitățile ei de măsură	577
XIII.1.5.3. Procese biochimice fundamentale prin care se generează ioni $H^+$ în organism	579
XIII.1.5.4. Sistemele tampon	581
<b>XIII.2. Elementele minerale</b>	584
XIII.2.1. Categoriile de elemente minerale din organism	584
XIII.2.2. Metabolismul general al elementelor minerale	585
XIII.2.3. Calciul	586
XIII.2.3.1. Sursele alimentare de calciu	587
XIII.2.3.2. Metabolismul calciului	587
XIII.2.3.3. Rolul metabolic	587
XIII.2.3.4. Necesarul de calciu	588
XIII.2.4. Fosforul	589
XIII.2.4.1. Sursele alimentare de fosfor	589
XIII.2.4.2. Metabolismul fosforului	590
XIII.2.4.3. Rolul metabolic	590
XIII.2.4.4. Necesarul de fosfor	591
XIII.2.5. Magneziul	591
XIII.2.5.1. Sursele alimentare de magneziu	592
XIII.2.5.2. Metabolismul magneziului	592
XIII.2.5.3. Rolul metabolic	592
XIII.2.5.4. Necesarul de magneziu	593
XIII.2.6. Sodiul	593
XIII.2.6.1. Sursele alimentare de sodiu	593
XIII.2.6.2. Metabolismul sodiului	594
XIII.2.6.3. Rolul metabolic	594
XIII.2.6.4. Necesarul de sodiu	595

PROTEINELE. STRUCTURA GENERALĂ		Pag.
XIII.2.7. Potasiul		596
XIII.2.7.1. Sursele alimentare de potasiu		596
XIII.2.7.2. Metabolismul potasiului		597
XIII.2.7.3. Rolul metabolic		598
XIII.2.7.4. Necesarul de potasiu		598
XIII.2.8. Clorul		599
XIII.2.8.1. Sursele alimentare de clor		599
XIII.2.8.2. Metabolismul clorului		599
XIII.2.8.3. Rolul metabolic		599
XIII.2.8.4. Necesarul de clor		600
XIII.2.9. Oligoelementele		600
XIII.2.9.1. Cobaltul		600
XIII.2.9.2. Cromul		601
XIII.2.9.3. Cuprul		601
XIII.2.9.4. Fierul		603
XIII.2.9.5. Iodul		605
XIII.2.9.6. Manganul		606
XIII.2.9.7. Molibdenul		607
XIII.2.9.8. Seleniul		607
XIII.2.9.9. Zincul		608

Proteinele sînt constituenți chimici ai organismelor vii cu cel mai înalt grad de complexitate, varietate moleculară și care prezintă specificitatea de specie, de organ. Denumirea lor derivă de la cuvîntul „proteină” care înseamnă, de prim rang, „cel dințu”.

Proteinele sînt substanțe macromoleculare de natură polipeptidică. La construcția proteinelor participă 20 de aminoacizi fundamentali, aceiași în toate viețuitoarele, de la cea mai simplă bacterie pînă la om. Prin legare în lanțuri polipeptidice, variate ca lungime și succesiune a unităților, se poate obține un număr nesfîrșit de combinații. În toate multiplicitatea posibilităților de combinare a aminoacizilor în lanțuri polipeptidice, la un anumit organism nu se realizează decît anumite secvențe, acelea care sînt specificate de materialul genetic, de ADN-ul parental. Proteinele sînt macromolecule informaționale; cu secvențe specifice de aminoacizi, sînt exprimate epigenetică a genomului celulei.

Proteinele îndeplinesc funcții fundamentale, specifice organismelor vii (tabelul I.1):

— ele au un rol structural, de susținere, construind materialul din care sînt construite toate structurile celulare, membrane, organe celulare, cel și matrice intercelular al țesuturilor și organelor. Proteinele există într-o varietate moleculară foarte mare, care asigură diversitatea și specificitatea de formă a tuturor ființelor vii;

— exercită acțiune catalitică — toate enzimele sînt proteine — determinînd varietatea nefrînă de reacții biochimice și specificul transformărilor chimice din organismele vii;

— proteinele contractile sînt instrumentele cu ajutorul cărora organismele vii îndeplinesc activitatea contractilă și locomotorie;

— îndeplinesc funcții reglatoare, ele putînd stoca și transmite mesaje chimice diverse;

— îndeplinesc funcții de transport și de depozitare a unor compuși chimici ca ioni metalici, vitamine, oxigen, dioxid de carbon;

— ele au sarcina de a apăra organismul împotriva unor corpuri străine, macromolecule, virusuri, bacterii. Reacțiile imunologice sînt mediate de o clasă de proteine specializate — immunoglobulinele.

500	XIII.2.9.4. Necesariul de sodiu	500
500	XIII.2.9.5. Necesariul de potasiu	500
500	XIII.2.9.6. Necesariul de calciu	500
500	XIII.2.9.7. Necesariul de fier	500
500	XIII.2.9.8. Necesariul de zinc	500
500	XIII.2.9.9. Necesariul de cupru	500
500	XIII.2.9.10. Necesariul de mangan	500
500	XIII.2.9.11. Necesariul de seleniu	500
500	XIII.2.9.12. Necesariul de iod	500
500	XIII.2.9.13. Necesariul de cobalt	500
500	XIII.2.9.14. Necesariul de crom	500
500	XIII.2.9.15. Necesariul de molibden	500
500	XIII.2.9.16. Necesariul de vanadiu	500
500	XIII.2.9.17. Necesariul de siliciu	500
500	XIII.2.9.18. Necesariul de bor	500
500	XIII.2.9.19. Necesariul de fluor	500
500	XIII.2.9.20. Necesariul de seleniu	500
500	XIII.2.9.21. Necesariul de vanadiu	500
500	XIII.2.9.22. Necesariul de crom	500
500	XIII.2.9.23. Necesariul de molibden	500
500	XIII.2.9.24. Necesariul de vanadiu	500
500	XIII.2.9.25. Necesariul de crom	500
500	XIII.2.9.26. Necesariul de molibden	500
500	XIII.2.9.27. Necesariul de vanadiu	500
500	XIII.2.9.28. Necesariul de crom	500
500	XIII.2.9.29. Necesariul de molibden	500
500	XIII.2.9.30. Necesariul de vanadiu	500
500	XIII.2.9.31. Necesariul de crom	500
500	XIII.2.9.32. Necesariul de molibden	500
500	XIII.2.9.33. Necesariul de vanadiu	500
500	XIII.2.9.34. Necesariul de crom	500
500	XIII.2.9.35. Necesariul de molibden	500
500	XIII.2.9.36. Necesariul de vanadiu	500
500	XIII.2.9.37. Necesariul de crom	500
500	XIII.2.9.38. Necesariul de molibden	500
500	XIII.2.9.39. Necesariul de vanadiu	500
500	XIII.2.9.40. Necesariul de crom	500
500	XIII.2.9.41. Necesariul de molibden	500
500	XIII.2.9.42. Necesariul de vanadiu	500
500	XIII.2.9.43. Necesariul de crom	500
500	XIII.2.9.44. Necesariul de molibden	500
500	XIII.2.9.45. Necesariul de vanadiu	500
500	XIII.2.9.46. Necesariul de crom	500
500	XIII.2.9.47. Necesariul de molibden	500
500	XIII.2.9.48. Necesariul de vanadiu	500
500	XIII.2.9.49. Necesariul de crom	500
500	XIII.2.9.50. Necesariul de molibden	500
500	XIII.2.9.51. Necesariul de vanadiu	500
500	XIII.2.9.52. Necesariul de crom	500
500	XIII.2.9.53. Necesariul de molibden	500
500	XIII.2.9.54. Necesariul de vanadiu	500
500	XIII.2.9.55. Necesariul de crom	500
500	XIII.2.9.56. Necesariul de molibden	500
500	XIII.2.9.57. Necesariul de vanadiu	500
500	XIII.2.9.58. Necesariul de crom	500
500	XIII.2.9.59. Necesariul de molibden	500
500	XIII.2.9.60. Necesariul de vanadiu	500
500	XIII.2.9.61. Necesariul de crom	500
500	XIII.2.9.62. Necesariul de molibden	500
500	XIII.2.9.63. Necesariul de vanadiu	500
500	XIII.2.9.64. Necesariul de crom	500
500	XIII.2.9.65. Necesariul de molibden	500
500	XIII.2.9.66. Necesariul de vanadiu	500
500	XIII.2.9.67. Necesariul de crom	500
500	XIII.2.9.68. Necesariul de molibden	500
500	XIII.2.9.69. Necesariul de vanadiu	500
500	XIII.2.9.70. Necesariul de crom	500
500	XIII.2.9.71. Necesariul de molibden	500
500	XIII.2.9.72. Necesariul de vanadiu	500
500	XIII.2.9.73. Necesariul de crom	500
500	XIII.2.9.74. Necesariul de molibden	500
500	XIII.2.9.75. Necesariul de vanadiu	500
500	XIII.2.9.76. Necesariul de crom	500
500	XIII.2.9.77. Necesariul de molibden	500
500	XIII.2.9.78. Necesariul de vanadiu	500
500	XIII.2.9.79. Necesariul de crom	500
500	XIII.2.9.80. Necesariul de molibden	500
500	XIII.2.9.81. Necesariul de vanadiu	500
500	XIII.2.9.82. Necesariul de crom	500
500	XIII.2.9.83. Necesariul de molibden	500
500	XIII.2.9.84. Necesariul de vanadiu	500
500	XIII.2.9.85. Necesariul de crom	500
500	XIII.2.9.86. Necesariul de molibden	500
500	XIII.2.9.87. Necesariul de vanadiu	500
500	XIII.2.9.88. Necesariul de crom	500
500	XIII.2.9.89. Necesariul de molibden	500
500	XIII.2.9.90. Necesariul de vanadiu	500
500	XIII.2.9.91. Necesariul de crom	500
500	XIII.2.9.92. Necesariul de molibden	500
500	XIII.2.9.93. Necesariul de vanadiu	500
500	XIII.2.9.94. Necesariul de crom	500
500	XIII.2.9.95. Necesariul de molibden	500
500	XIII.2.9.96. Necesariul de vanadiu	500
500	XIII.2.9.97. Necesariul de crom	500
500	XIII.2.9.98. Necesariul de molibden	500
500	XIII.2.9.99. Necesariul de vanadiu	500
500	XIII.2.9.100. Necesariul de crom	500

BCU IASHOVA CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



# Cap. I. PROTEINELE, STRUCTURĂ GENERALĂ

Funcțiile fundamentale pe care le îndeplinesc proteinele

Funcția

Proteina

## Introducere

Proteinele sînt constituenți chimici ai organismelor vii cu cel mai înalt grad de complexitate, varietate moleculară și care prezintă specificitate de specie, de organ. Denumirea lor derivă de la cuvîntul „proteios” care înseamnă, de prim rang, cel dintîi.

Proteinele sînt substanțe macromoleculare de natură polipeptidică. La construcția proteinelor participă 20 de aminoacizi fundamentali, aceiași la toate viețuitoarele, de la cea mai simplă bacterie pînă la om. Prin legare în lanțuri polipeptidice, variate ca lungime și succesiune a unităților, se poate obține un număr nesfîrșit de combinații. Cu toată multiplicitatea posibilităților de combinare a aminoacizilor în lanțuri polipeptidice, la un anumit organism nu se realizează decît anumite secvențe, acelea care sînt specificate de materialul genetic, de ADN-ul parental. Proteinele sînt macromolecule informaționale, cu secvențe specifice de aminoacizi, sînt expresia epigenetică a genomului celular.

Proteinele îndeplinesc funcții fundamentale, specifice organismelor vii (tabelul I.1):

— ele au un rol structural major, constituind materialul din care sînt construite toate structurile celulare, membrane, organite celulare, ca și materialul intercelular al țesuturilor și organelor. Proteinele există într-o varietate moleculară foarte mare și ele asigură diversitatea și specificitatea de formă a tuturor ființelor vii;

— exercită acțiuni catalitice — toate enzimele sînt proteine — determinînd varietatea nesfîrșită de reacții biochimice și specificul transformărilor chimice din organisme vii;

— proteinele contractile sînt instrumentele cu ajutorul cărora organismele vii îndeplinesc activitatea contractilă și locomotorie;

— îndeplinesc funcții reglatoare, ele putînd stoca și transmite mesaje chimice diverse;

— îndeplinesc funcții de transport și de depozitare a unor compuși chimici ca ioni metalici, vitamine, oxigen, dioxid de carbon;

— ele au sarcina de a apăra organismul împotriva unor corpi străini, macromolecule, virusuri, bacterii. Reacțiile imunologice sînt mediate de o clasă de proteine specializate — imunoglobulinele.



Funcțiile fundamentale pe care le îndeplinesc proteinele

Proteina	Funcție
Colagen	Principala proteină a țesuturilor conjunctive
Histona	Proteină nucleară asociată cu ADN
Spectrina	Proteină eritrocitară cu rol în menținerea formei celulare
Amilaza	Enzimă, participă la digestia amidonului
Pepsina	Enzimă, participă la digestia proteinelor
Glicogen sintetaza	Enzimă, participă la sinteza glicogenului
Lactat dehidrogenază	Enzimă, catalizează oxidarea lactatului la piruvat
Actină	Proteină contractilă din mușchi
Miozină	Proteină contractilă din mușchi
Insulina	Hormon pancreatic, hipoglicemiant
Hormonul de creștere	Hormon hipofizar
Serumalbumina	Proteină plasmatică, transportă ioni, vitamine, hormoni
Hemoglobina	Transportă oxigenul în sistemul circulator
Transferina	Transportă ioni de fier în plasmă
Feritina	Forma de depozitare a fierului
Citochromii	Transportă electroni
Imunoglobulinele	Anticorpi care fixează și imobilizează agenții bacterieni
Fibrinogen	Proteină plasmatică cu rol în coagularea sângelui

## I.1. AMINOACIZII

Unitățile constituente ale proteinelor sînt aminoacizii, care prin legătura peptidică între gruparea aminică a unei molecule și gruparea carboxil a altei molecule dau naștere la macromoleculele proteice. Există 20 aminoacizi proteogeni specificați prin codul genetic, prezenți în toate organismele vii, de la cele mai simple pînă la om. Alături de acești 20 aminoacizi fundamentali, în proteine se mai întîlnesc alți cîțiva, care rezultă de fapt prin modificări chimice ale acestora după incorporare în lanțurile polipeptidice (hidroxiprolina, hidroxilizina etc.). Totodată, se mai întîlnesc și unii aminoacizi cu alte funcții, ca ornitina, citrulina.

Aminoacizii naturali, au formula generală  $R-CH-COOH$ ; sînt

$\alpha$ -aminoacizi. Face excepție unul din cei 20 de aminoacizi, prolina, care are o funcție aminică secundară.

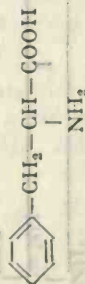
Diversitatea aminoacizilor naturali este dată de natura lui R care poate fi o catenă hidrocarbonată alifatică sau aromatică, un heterociclu sau care poate să cuprindă o funcție adițională. În tabelul I.2 se dau formulele celor 20 de aminoacizi naturali, denumirile raționale și prescurtările de trei litere și de o literă ale aminoacizilor.

Proprietățile fizice ale aminoacizilor. Toți aminoacizii sînt substanțe solide, cu puncte de topire ridicate, mai mari de  $200^\circ$  și se descompun înainte de a

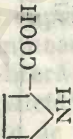
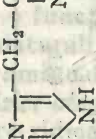

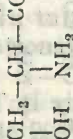
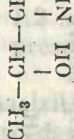
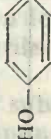
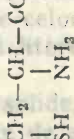
Tabel 1.2

## Structurile și denumirile aminoacizilor proteogenici

Formulă structurală	Denumirea uzuală	Denumirea rațională	Prescurtarea de trei litere	Simbol de o literă
1	2	3	4	5
$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Glicocol (glicină)	Acid aminoacetic	Gli	G
$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Alanină	Acid α-aminopropionic	Ala	A
$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \quad   \\ \text{NH}_2 \quad \text{CH}_3 \end{array}$	Valină	Acid α-aminoizovalerianic	Val	V
$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\   \quad   \\ \text{NH}_2 \quad \text{CH}_3 \end{array}$	Leucină	Acid α-aminoizocaproic	Leu	L
$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \quad   \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \end{array}$	Izoleucină	Acid α-amino β-metilvalerianic	Ile	I
$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \quad   \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \end{array}$	Fenilalanină	Acid α-amino 3-fenilpropionic	Phe	F



Tabel 1.2 (continuare)

1	2	3	4	5
<chem>NC(=O)C1CCNC1</chem> 	Prolină	Acid pirolidin $\alpha$ -carboxilic	Pro	P
<chem>NC(CCC(=O)O)C1=CN=CN=C1</chem> 	Histidină	Acid $\alpha$ -amino- $\beta$ -imidazolilpropionic	His	H
<chem>NC(CCC(=O)O)c1ccc2c(c1)c(c[nH]2)</chem> 	Triptofan	Acid $\alpha$ -amino- $\beta$ -indolilpropionic	Trp	W
<chem>NC(C(CO)C(=O)O)C(=O)O</chem> 	Serină	Acid $\alpha$ -amino- $\beta$ -hidroxipropionic	Ser	S
<chem>NC(C(CO)C(=O)O)C(=O)O</chem> 	Treonină	Acid $\alpha$ -amino- $\beta$ -hidroxibutiric	Thr	T
<chem>NC(CCC(=O)O)c1ccc(O)cc1</chem> 	Tirozină	p-Hidroxifenilalanină	Tyr	Y
<chem>NC(C(CS)C(=O)O)C(=O)O</chem> 	Cisteină	Acid $\alpha$ -amino- $\beta$ -tiopropionic	Cys	C



$\text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH}$   $\text{NH}_2$	Metionină	Acid $\alpha$ -amino-5-metil-tiobutiric	Met	M
$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH}$   $\text{NH}_2$	Acid aspartic	Acid aminosuccinic	Asp	D
$\text{H}_2\text{NOC}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH}$   $\text{NH}_2$	Asparagină	Acid $\alpha$ -amino- $\beta$ -amido succinic	Asn	N
$\text{HOOC}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH}$   $\text{NH}_2$	Acid glutamic	Acid $\alpha$ -aminoglutaric	Glu	N
$\text{H}_2\text{NOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH}$   $\text{NH}_2$	Glutamină	Acid $\alpha$ -amino- $\gamma$ -amidoglutaric	Gln	Q
$\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH}$   $\text{NH}_2$	Lizină	Acid $\alpha$ , $\epsilon$ -diaminocaproic	Lys	K
$\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH}$   $\text{NH}_2$   $\text{C}=\text{NH}$   $\text{NH}_2$	Arginină	Acid $\alpha$ -amino- $\delta$ -guanidinovaleric	Arg	R



Tabel I.3

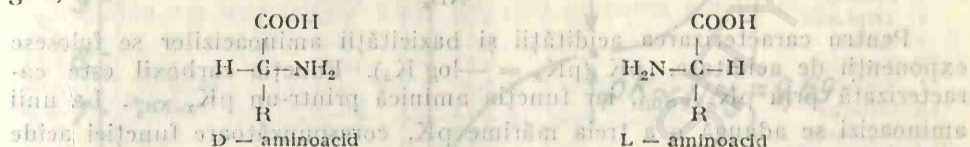
## Aminoacizi neproteinogeni

Formula structurală	Denumire uzuală	Denumire științifică	Funcție
$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$	$\beta$ -Alanina	Acid $\beta$ -aminopropionic	Component al coenzimei A
$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$	Acid $\gamma$ -Aminobutiric, GABA	—	Neurotransmițător
$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$	Acid-Aminolevulinic		Intermediar în biosinteza hemului
$\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	Citrulina	Acid $\alpha$ -amin- $\gamma$ -amidino- valerianic	Intermediar al ciclului ureogenic
$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	Ornitina	Acid $\alpha$ , $\delta$ -diamino- valerianic	Intermediar al ciclului ureogenic
$\text{HS}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	Homocisteina	Acid $\alpha$ -amino- $\gamma$ -tiobutiric	Intermediar în metabolismul aminoacizilor
$\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	Homoserina	Acid $\alpha$ -amino- $\gamma$ -hidroxibutiric	Intermediar în metabolismul aminoacizilor
$\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{COOH}$	Acid-p-aminobenzoic		Factor de creștere pentru bacterii, component al acidului folic

se topi. Aminoacizii se dizolvă, într-o măsură mai mare sau mai mică, în apă, sînt greu solubili în solvenți nepolari ca eter, cloroform, benzen, sînt ușor solubili în soluții diluate de acizi și baze.

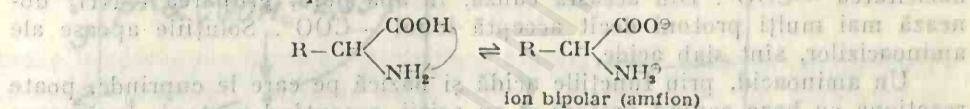
**Isomeria optică a aminoacizilor.** Toți aminoacizii, cu excepția glicocolului, posedă un centru chiralic (un carbon asimetric) care este  $C_\alpha$ :

$$\begin{array}{c} \text{R}-\text{CH}^*-\text{COOH} \\ | \\ \text{NH}_2 \end{array}$$
 Izoleucina și treonina au un carbon asimetric adițional, atomul  $C_\beta$ . Formulele de configurație ale enantiomerilor unui aminoacid oarecare, reprezentate în sistemul D—L, în care substanța de referință este aldehida glicerică dextro-giră, sînt:

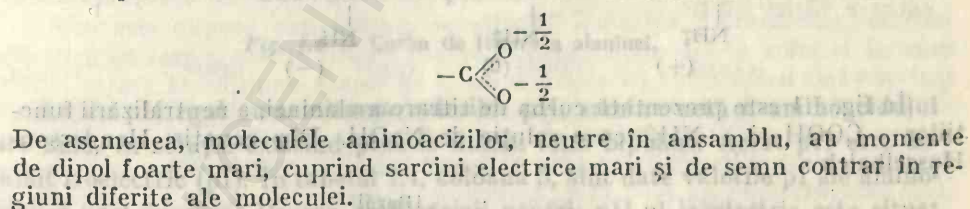


În structura proteinelor nu se întîlnesc decît L — aminoacizi. Aminoacizii din seria D apar numai ocazional, în special la unele microorganisme și totdeauna au roluri specifice.

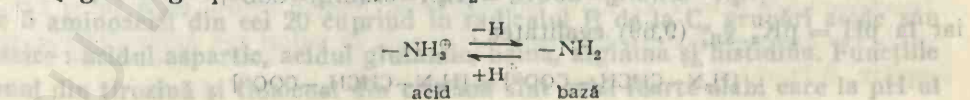
**Proprietățile acidobazice ale aminoacizilor.** Aminoacizii cuprind o grupare  $-\text{NH}_2$  bazică și una  $-\text{COOH}$  acidă și între aceste două funcții poate avea loc transferul de protoni:



Datorită interacțiunilor electronice posibile între cele două funcții învecinate, echilibrul reacției este deplasat aproape în totalitate spre dreapta, practic aminoacizii (monoaminocarboxilici), în cristale ca și în soluție, există numai sub formă de amfioni (ioni bipolari). Structura bipolară a aminoacizilor este susținută de numeroase fapte. Prin măsurători de distanțe interatomice s-a găsit că în gruparea carboxil distanțele  $\text{C}-\text{O}$  sînt egale (1,26 Å); ele corespund ionului carboxilat, unde are loc conjugarea  $\pi - p$ :

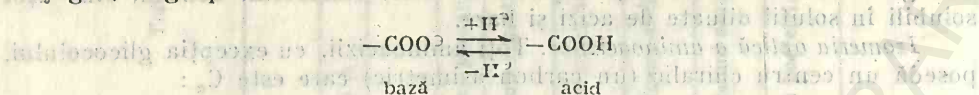


Ionii bipolari ai aminoacizilor rămîn în continuare amfioți, au atît caracter acid, cît și caracter bazic. Funcția acidă actuală a unui aminoacid (monoaminocarboxilic) este gruparea aminică protonată,  $-\text{NH}_3^+$ , acidul conjugat al grupării aminice,  $-\text{NH}_2$ :

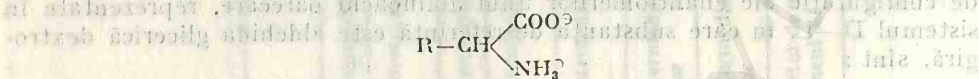




Funcția bazică a unui aminoacid este ionul carboxilat  $\text{—COO}^\ominus$ , baza conjugată a grupării carboxil :



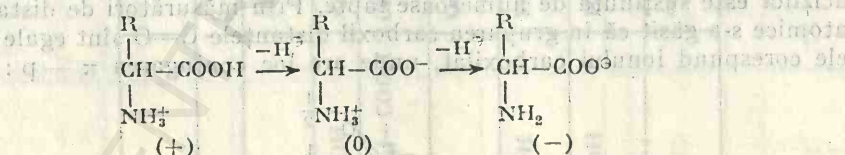
Unii aminoacizi, ca lizina, acidul glutamic, acidul aspartic, cuprind în radicalul de la  $\text{C}_\alpha$  grupări acide sau bazice adiționale. Pentru început, în examinarea comportării aminoacizilor ca acizi și baze, se iau în considerație numai aminoacizii monoaminomonocarboxilici (aminoacizi neutri) :



Pentru caracterizarea acidității și bazicității aminoacizilor se folosesc exponenții de aciditate,  $\text{pK}$  ( $\text{pK}_a = -\log K_a$ ). Funcția carboxil este caracterizată prin  $\text{pK}_{\alpha\text{—COOH}}$ , iar funcția aminică printr-un  $\text{pK}_{\alpha\text{—NH}_3^\oplus}$ . La unii aminoacizi se adaugă o a treia mărime  $\text{pK}$ , corespunzătoare funcției acide adiționale.

În tabelul I.4 se dau valorile  $\text{pK}$  ale celor 20 de aminoacizi naturali. Din examinarea datelor din tabelul I.4 se remarcă, în primul rînd, faptul că funcția  $\text{—COOH}$  este un acid mai puternic ( $\text{pK} \approx 2$ ) decît gruparea similară a acizilor carboxilici oarecari ( $\text{pK}$  pentru acidul acetic este de 4,76). Aciditatea grupării  $\text{—NH}_3^\oplus$  este redusă ( $\text{pK} = 9\text{—}10$ ), dar întrec totuși bazicitatea  $\text{—COO}^\ominus$ . Din această cauză, în apă pură, gruparea  $\text{—NH}_3^\oplus$  donează mai mulți protoni decît acceptă ionul  $\text{—COO}^\ominus$ . Soluțiile apoase ale aminoacizilor, sînt slab acide.

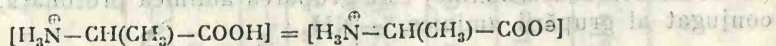
Un aminoacid, prin funcțiile acidă și bazică pe care le cuprinde, poate reacționa cu baze cedînd protoni și cu acizii, acceptînd protoni. Încărcarea electrică a unui aminoacid va depinde de  $\text{pH}$ -ul soluției. Dacă un aminoacid se află într-o soluție puternic acidă ( $\text{pH} = 0\text{—}1$ ) grupările acceptoare de protoni sînt protonate în totalitate. La titrarea acestuia cu o bază tare ( $\text{HO}^\ominus$ ) protonii sînt eliberați în ordinea descrescătoare acidității funcțiilor acide :



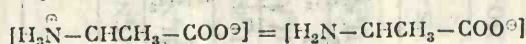
În fig. I.1 este prezentată curba de titrare a alaninei, a neutralizării funcțiilor  $\text{—COOH}$  și  $\text{—NH}_3^\oplus$  cu o soluție de  $\text{NaOH}$ . Din ecuația Henderson-Hasselbalch :

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{Bază}]}{[\text{Acid}]}$$

rezultă că la un  $\text{pH}$  egal cu  $\text{pK}_{\alpha\text{—COOH}}$  (2,35) există egalitatea :



iar la  $\text{pH} = \text{pK}_{\alpha\text{—NH}_3^\oplus}$  (9,69) egalitatea :



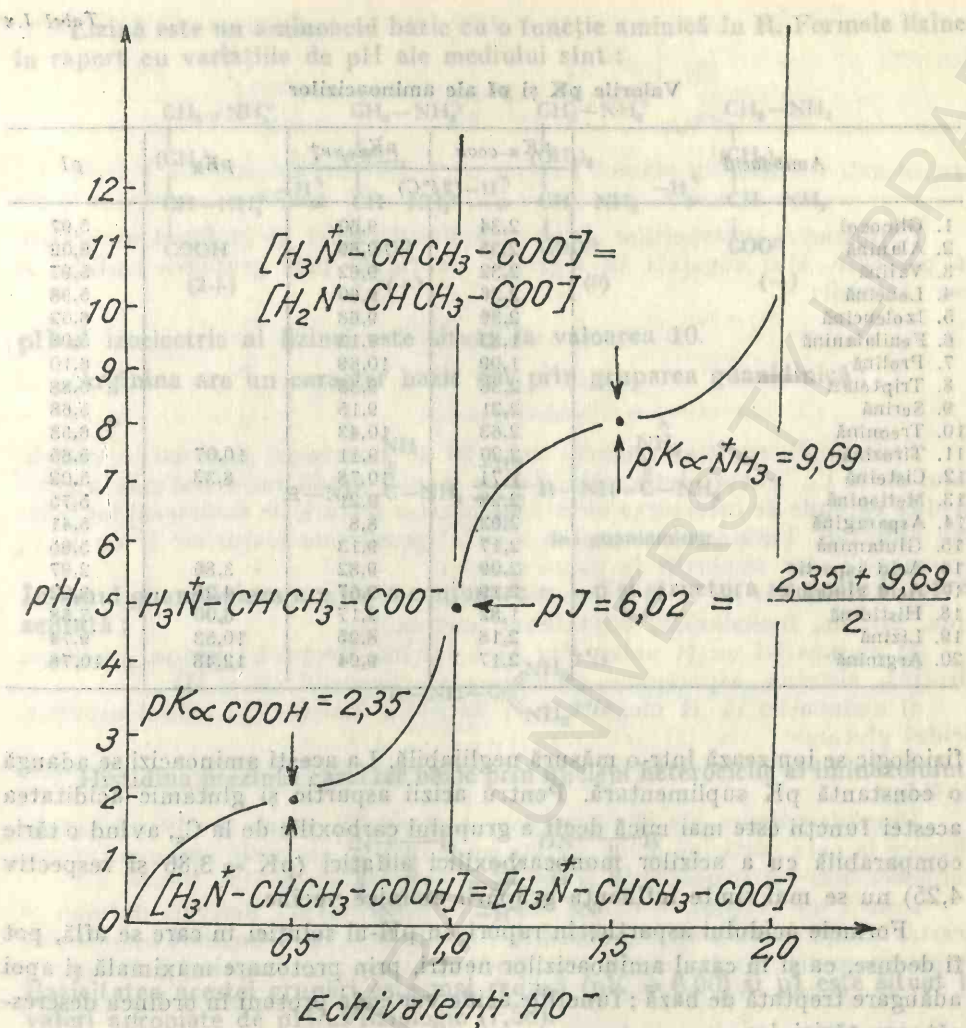


Fig. I.1 — Curba de titrare a alaninei.

La un pH egal cu semisuma valorilor  $\text{pK}$ , sarcina netă a aminoacidului este nulă, în soluție existind practic numai ionii bipolari. Acest pH este denumit izoelectric ( $\text{pI}$ ). În tabelul I.4, coloana 5, sînt date valorile  $\text{pI}$  ale aminoacizilor proteinogeni. Pentru aminoacizii neutri, pH-ul izoelectric este situat la valori de aproximativ 6, pH puțin inferior pH-ului fiziologic. La  $\text{pH} = \text{pI}$  solubilitatea aminoacizilor este minimă.

**Comportarea aminoacizilor cu grupări acide și bazice adiționale.** Un număr de 5 aminoacizi din cei 20 cuprind în radicalul R de la  $\text{C}_\alpha$  grupări acide sau bazice: acidul aspartic, acidul glutamic, lizina, arginina și histidina. Funcțiile fenol din tirozină și tioalcool din cisteină sînt acizi foarte slabi care la pH-ul

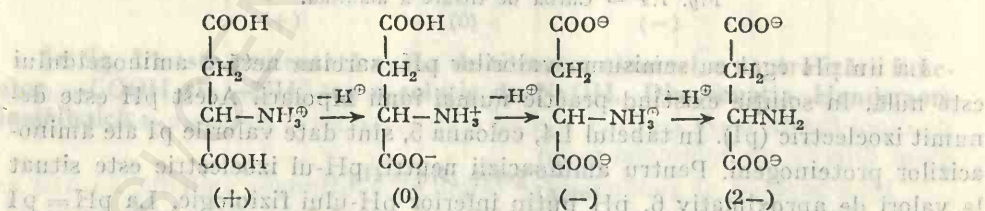


Valorile  $pK$  și  $pI$  ale aminoacizilor

Aminoacid	$pK_{\alpha-COOH}$	$pK_{\alpha-NH_3^+}$	$pK_R$	$pI$
	(25°C)			
1. Glicocol	2,34	9,60		5,97
2. Alanină	2,35	9,69		6,02
3. Valină	2,32	9,62		5,97
4. Leucină	2,36	9,60		5,98
5. Izoleucină	2,36	9,68		6,02
6. Fenilalanină	1,83	9,13		5,98
7. Prolină	1,99	10,69		6,10
8. Triptotan	2,38	9,38		5,88
9. Serină	2,21	9,15		5,68
10. Treonină	2,63	10,43		6,53
11. Tirozină	2,20	9,11	10,07	5,65
12. Cisteină	1,71	10,78	8,33	5,02
13. Metionină	2,28	9,21		5,75
14. Asparagină	2,02	8,8		5,41
15. Glutamină	2,17	9,13		5,65
16. Acid aspartic	2,09	9,82	3,86	2,97
17. Acid glutamic	2,19	9,67	4,25	3,22
18. Histidină	1,82	9,17	6,00	7,58
19. Lizină	2,18	8,95	10,53	9,74
20. Arginină	2,17	9,04	12,48	10,76

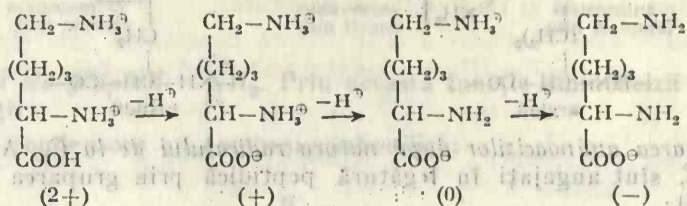
fiziologic se ionizează într-o măsură neglijabilă. La acești aminoacizi se adaugă o constantă  $pK$  suplimentară. Pentru acizii aspartic și glutamic aciditatea acestei funcții este mai mică decât a grupului carboxilic de la  $C_\alpha$ , avînd o tărie comparabilă cu a acizilor monocarboxilici alifatici ( $pK = 3,86$  și respectiv 4,25) nu se mai simte influența grupării aminice vecine.

Formele acidului aspartic, în raport cu  $pH$ -ul soluției în care se află, pot fi deduse, ca și în cazul aminoacizilor neutri, prin protonare maximală și apoi adăugare treptată de bază; funcțiile acide vor ceda protoni în ordinea descrescătoare tăriei lor:



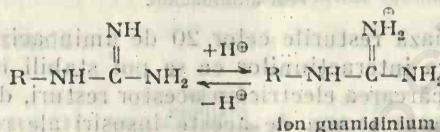
$pH$ -ul izoelectric al acestor aminoacizi este dat de semisuma valorilor  $pK$  a funcțiilor care generează ionul sarcină netă. Pentru acidul aspartic și acidul glutamic punctele lor izoelectrice sînt situate la valori net acide (2,97 și, respectiv, 3,2).

Lizina este un aminoacid bazic cu o funcție aminică în R. Formele lizinei în raport cu variațiile de pH ale mediului sînt:

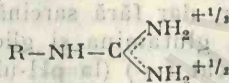


pH-ul izoelectric al lizinei este situat la valoarea 10.

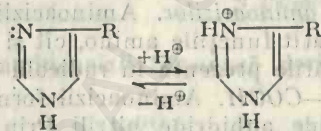
Arginina are un caracter bazic net prin gruparea guanidinică:



În ionul guanidinium are loc o conjugare  $\pi$  — p și structura sa poate fi reprezentată:

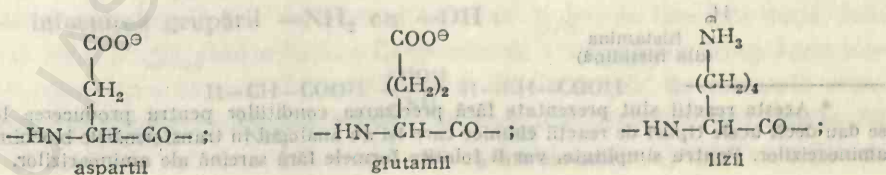


Histidina prezintă caracter bazic prin nucleul heterociclic al imidazolului:

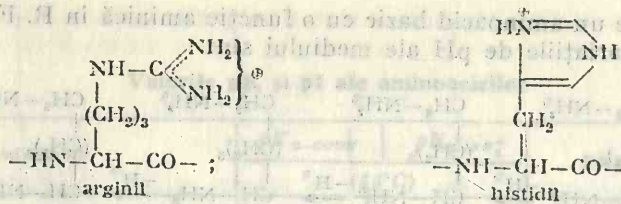


Bazicitatea acestei grupări este mai redusă ( $\text{pK} = 6,00$ ) și pI este situat la valori apropiate de pH-ul fiziologic (7,58).

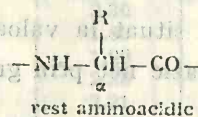
Din cele expuse mai înainte rezultă că ionizarea aminocizilor, sarcina electrică pe care o poartă fiecare dintre ei depinde de pH-ul soluției în care sînt cuprinși. Dacă ținem seama că în organismele vii aminoacizii sînt cuprinși în lanțurile polipeptidice ale proteinelor este important de examinat comportarea, ca acizi sau baze, resturilor aminoacide  $-\text{NH}-\text{CH}(\text{R})-\text{CO}-$ , sarcina electrică pe care o poartă aceste resturi la pH-ul fiziologic. Resturile aspartil și glutamil au, în aceste condiții, o sarcină netă (—) pe cînd resturile lizil, arginil și histidil au sarcina (+).







**Clasificarea aminoacizilor după natura radicalului de la C $\alpha$ .** Aminoacizii, în proteine, sînt angajați în legătură peptidică prin gruparea aminică și cea carboxil:



Ceea ce diferențiază resturile celor 20 de aminoacizi este natura radicalului de la C $\alpha$ . Natura interacțiunilor ce se pot stabili între resturile aminoacide depinde de încărcarea electrică a acestor resturi, de caracterul lor polar sau hidrofof. Ținîndu-se seama de aceste însușiri ale resturilor R de la C $\alpha$  aminoacizii sînt împărțiți în patru grupe:

a) aminoacizi cu R hidrofof, nepolari: alanina, valina, leucina, izoleucina, prolina, fenilalanina, triptofanul, metionina;

b) aminoacizi cu R polar, dar fără sarcină electrică: serina, treonina, tirozina, cisteina, asparagina, glutamina și glicocolul (R = H);

c) aminoacizi cu R încărcat (–) (la pH-ul fiziologic): acidul aspartic, acidul glutamic;

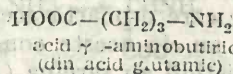
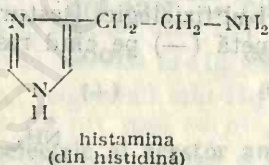
d) aminoacizi cu R încărcat (+) (la pH-ul fiziologic): lizina, arginina, histidina.

**Reacțiile chimice ale aminoacizilor.** Aminoacizii prezintă diverse reacții chimice la care participă atît funcțiile amino, cît și carboxil, comune tuturor aminoacizilor, cît și grupările prezente în radicalii de la C $\alpha$ .

**Reacții ale grupării –COOH.** Aminoacizii formează derivați normali ai acestei funcții: esteri, amide, anhidride, nitrili. Prin decarboxilare aminoacizii formează amine, multe dintre ele fiind substanțe cu proprietăți fiziologice și farmacologice remarcabile (amine biogene).

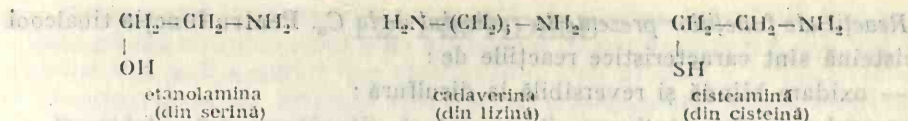


Unele amine, produși ai reacției de decarboxilare a aminoacizilor, sînt arătate mai jos:



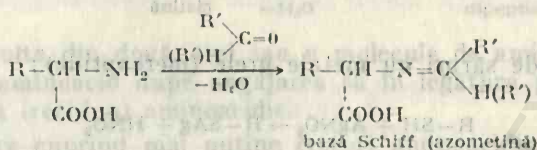
\* Aceste reacții sînt prezentate fără precizarea condițiilor pentru producerea lor. Nu se dau decît acele tipuri de reacții chimice care își au analogul în transformările biochimice ale aminoacizilor. Pentru simplitate, vor fi folosite formele fără sarcină ale aminoacizilor.



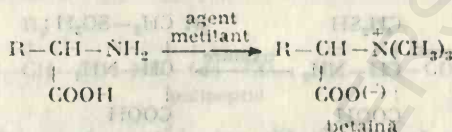


**Reacții ale grupării  $-\text{NH}_2$ .** Prin această funcție aminoacizii dau numeroase reacții:

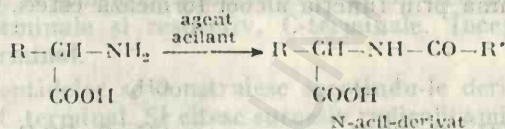
— de condensare cu compuși carbonilici:



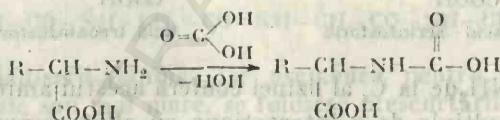
— de alchilare totală:



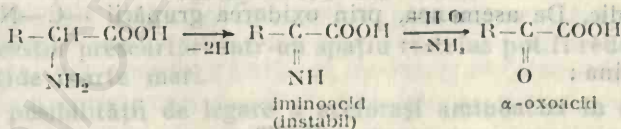
— de acilare:



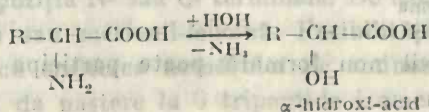
Cu acidul carbonic aminoacizii formează derivați carbaminoacizi:



— de oxidare:

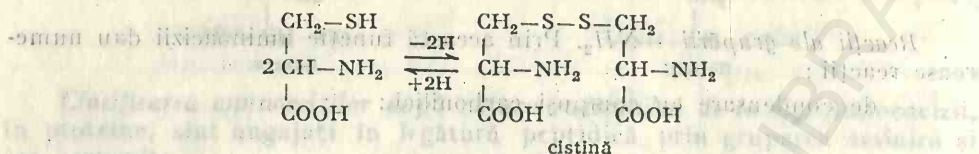


— înlocuirea grupării  $-\text{NH}_2$  cu  $-\text{OH}$ :

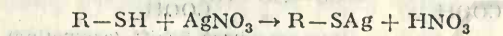


**Reacții ale funcțiilor prezente în radicalul de la C<sub>α</sub>.** Pentru funcția tioalcool din cisteină sînt caracteristice reacțiile de :

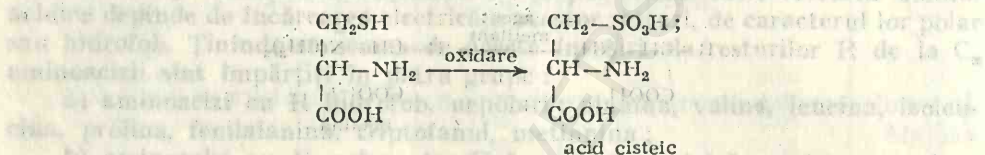
— oxidare blîndă și reversibilă la disulfură :



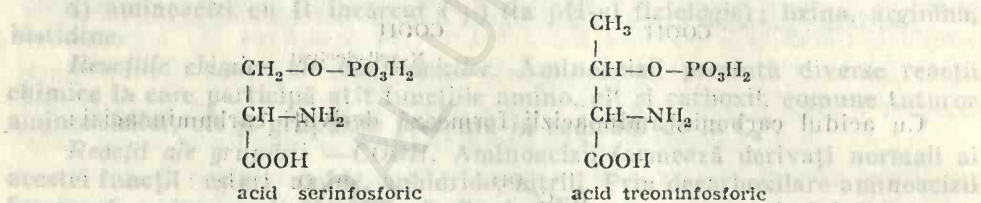
— formare de săruri cu metale grele (mercaptide) :



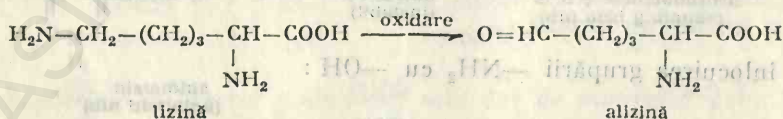
— oxidare energetică la acid cisteic :



Serina și treonina prin funcția alcool formează esteri, cu acidul fosforic rezultă :



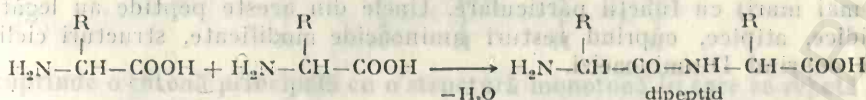
Gruparea —NH<sub>2</sub> de la C<sub>ε</sub> al lizinei conferă acestui aminoacid, sau restului lizil, posibilități multiple de a interacționa cu alți compuși. Condensarea cu funcții carboxil este una dintre proprietățile cele mai importante ale acestui rest aminoacidic. De asemenea, prin oxidarea grupării —C—NH<sub>2</sub> din lizină se obține alizina :



Gruparea carboxil nou formată poate participa mai departe la alte reacții.

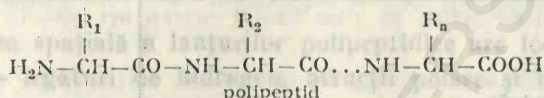
## I.2. PEPTIDELE

Peptidele sînt combinații de tip amidic rezultate prin condensarea a două sau mai multe molecule de aminoacizi :



Peptidele pot rezulta din două, trei sau  $n$  molecule de aminoacizi. Ceea ce rămâne dintr-un aminoacid după angajarea sa în legătura peptidică poartă denumirea de rest (reziduu) aminoacidic.

Peptidele care cuprind mai puține resturi aminoacidice sînt denumite oligopeptide, iar acelea cu un număr mai mare de resturi aminoacidice sînt polipeptide :



Capetele moleculei unui peptid sînt diferite, unul are grupare aminică liberă, capăt N-terminal, iar celălalt are gruparea carboxil neangajată, este capătul C terminal. Resturile de aminoacizi de la capetele moleculei sînt denumite resturi N-terminale și respectiv, C-terminale. Începutul unui peptid este capătul N-terminal.

Denumirile peptidelor se construiesc socotindu-le derivați acilați ai restului aminoacidic C-terminal. Se citesc succesiv radicalii aminoacizilor începînd cu capătul N-terminal pînă la restul C-terminal. De exemplu tetrapeptidul:



Se citește valil-glicil-seril-alanină. De asemenea pentru redarea structurii unui peptid, mai mic sau mai mare, se folosesc prescurtările de trei litere sau de o singură literă pentru aminoacizi. În acest sistem tetrapeptidul de mai sus este redat :

Val-Gly-Ser-Ala sau VGSA

Cu ajutorul acestor prescurtări într-un spațiu restrâns pot fi redată structurile unor polipeptide foarte mari.

Datorită posibilității de legare a aceluiași aminoacizi în secvențe diferite, peptidele pot prezenta fenomenul de izomerie de structură, de poziție. Doi aminoacizi diferiți pot da naștere la două dipeptide izomere după cum unul sau altul ocupă poziția N- sau C- terminală. De exemplu dipeptidele izomere leucil-metionină sau metionil-leucină. Posibilitățile de izomerie cresc foarte repede odată cu creșterea numărului de aminoacizi. Trei aminoacizi distincți A, B, C pot da naștere la 6 tripeptide izomere (peptidul cuprinde



cite un rest din fiecare aminoacid). Din patru aminoacizi 24 tetrapeptide, din cinci 120. Un icosapeptid (cu 20 resturi) în care fiecare din cei 20 de aminoacizi este cuprins o singură dată poate exista sub formă a  $2 \times 10^{18}$  izomeri. Posibilitatea legării aminoacizilor în secvențe nesfârșit de numeroase stă la baza multiplicității și varietății moleculare a proteinelor.

În organismele vii se întâlnesc numeroase peptide (oligopeptide sau peptide mai mari) cu funcții particulare. Unele din aceste peptide au legături peptidice, atipice, cuprind resturi aminoacide modificate, structuri ciclice, altele cuprind D-aminoacizi.

Tabel I.4

Conținutul în elice-alfa al unor proteine (evaluat prin metoda dispersiei activității optice)

Proteina	% elice alfa
Mioglobină	70
Insulină	38
Ovalbumină	31
Serum albumină (bovină)	46
Pepsină	31
Ribonuclează	16
Chimiotripsină	15

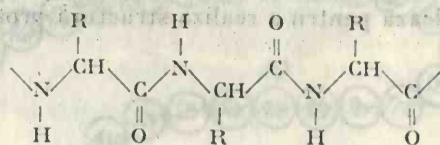
### I.3. PROTEINELE

Proteinele au structură polipeptidică. Granița dintre polipeptide propriu-zise și proteine este arbitrară. La un anumit grad de complexitate a lanțurilor polipeptidice apar nivele superioare de organizare și calități noi neîntâlnite la polipeptidele mai mici.

Proteinele, alături de acizii nucleici, sînt macromolecule ce există într-o varietate foarte mare. Fiecare tip de celulă, fiecare individ, fiecare specie, posedă un set distinct de proteine. Se estimează că numărul de tipuri de proteine din întreaga lume vie este de  $10^{10}$ — $10^{12}$  și potențialul de diversitate nu este epuizat. Chiar proteinele care îndeplinesc funcții similare la specii diferite sînt entități distincte, cu mase și proprietăți diferite.

Chimia proteinelor este deosebit de complexă ca presupunînd, mai întîi, înțelegerea principiilor generale de construcție a moleculelor proteice, a modului în care dintr-un număr limitat de unități structurale se pot forma infinit de multe proteine și ce factori intervin în realizarea arhitecturii lor. În al doilea rînd, studiul proteinelor necesită abordarea fiecărui tip de proteină în parte, stabilirea pentru fiecare specie moleculară a constituției chimice, a arhitecturii ei spațiale și a funcției sau funcțiilor pe care le exercită.

Structura polipeptidică este aptă să asigure proteinelor cele două caractere, diversitate moleculară, pe de o parte și specificitate de formă, pe de altă parte. Un polipeptid:



cuprinde o catenă principală cu o structură monotonă în care se repetă grupul

de atomi  $-NH-CH-CO-$ . Varietatea lanțurilor este asigurată de radicalii R legați la  $C_\alpha$ . Cu ajutorul celor 20 radicali diferiți se pot obține combinații multiple, deosebite prin numărul și secvența resturilor aminoacidice. Lanțurile polipeptidice, unidimensionale și flexibile, se convertesc spontan în edificii cu trei dimensiuni, cu forme caracteristice pentru o anumită secvență de aminoacizi.

Organizarea spațială a lanțurilor polipeptidice are loc prin interacțiuni necovalente — legături de hidrogen, atracții polare și ionice, interacțiuni hidrofobe — la care participă atât grupările  $>C=O$  și  $>NH$  din catena polipeptidică, cât și diversele grupări cuprinse în catenele laterale ale lanțului.

Complexitatea proteinelor a făcut necesară introducerea mai multor trepte de organizare structurală denumite structură primară, secundară, terțiară și structură cuaternară. Structura primară precizează numărul și secvența resturilor aminoacidice din moleculă, redă totalitatea legăturilor covalente din moleculă, fiind denumită și structură covalentă. Structura primară corespunde formulelor structurale uzuale ale unui compus organic. La moleculele simple astfel de formule definesc în același timp și relațiile spațiale dintre atomi. La proteine cu lanțuri lungi și un număr foarte mare de atomi sînt posibile numeroase conformații (aranjamente spațiale rezultate prin rotația liberă a atomilor sau grupurilor de atomi în jurul legăturilor simple) și este necesară ierarhizarea nivelelor de organizare spațială.

Structurile secundare rezultate din interacțiunile grupelor  $>C=O$  și  $>NH$  din grupările peptidice, sînt structuri ordonate, periodice, elementul structural care le generează prezintă el însuși regularitate. Structura terțiară a unui lanț polipeptidic înglobează nivelul de organizare secundar la care se adaugă modul de pliere, împachetare a lanțului polipeptidic determinat de interacțiunile posibile între radicalii R de la  $C_\alpha$ , interacțiuni ce depind atât de natura acestor radicali, cât și de relațiile de vecinătate dintre ei. Descrierea organizării spațiale a unui lanț polipeptidic prin structură secundară și terțiară este arbitrară, cele două nivele structurale se întrepătrund, împreună ele definesc conformația specifică a lanțului.



Proteinele alcătuite din mai multe lanțuri polipeptidice (proteine oligomere) cuprind un nivel cuaternar de organizare. Structura cuaternară a unei proteine oligomere descrie modul în care lanțurile polipeptidice individuale se asociază, se asamblează pentru a realiza structura proteinei date, structura sa funcțională.

### I.3.1. STRUCTURA PRIMARĂ A PROTEINELOR

Prima proteină a cărei structură primară a fost stabilită este insulina (Sanger, 1953), proteină mică avînd 51 resturi aminoacidice (Fig. I.2). După aceasta a urmat ribonucleaza (Fig. I.3) cu 124 aminoacizi. Numărul proteinelor a căror structură primară este cunoscută astăzi depășește 3 000.

Cunoașterea structurilor primare are o importanță deosebită pentru înțelegerea rolurilor proteinelor, ea deschizînd orizonturi noi în toate științele biologice:

- prin studii de secvențializare s-a stabilit definitiv că o proteină dată are o structură unică, nu este o colecție de specii moleculare diferite (cum este cazul polimerilor de sinteză);
- nu există regularitate în înlanțuirea aminoacizilor, nu există anumite secvențe preferate față de altele astfel că dacă la o proteină cu 100 resturi aminoacidice se cunoaște natura și secvența a 99 dintre ei nu există nici o regulă care să permită prevederea celui de al 100-lea;
- structurile primare ale proteinelor constituie baza înțelegerii la nivel molecular a activității lor biologice;
- prin compararea structurilor primare a proteinelor care îndeplinesc funcții omoloage la organisme diferite se poate stabili gradul de varietate structurală compatibilă cu o anumită funcție și aceste comparații permit urmărirea istoriei evolutive a proteinei;
- secvența aminoacizilor într-o proteină este veriga între mesajul genetic înscris în ADN și expresia acestui mesaj;
- studiile de secvențializare au dus la descoperirea unor specii de proteine anormale (proteine mutante) ca expresie a unor modificări la nivelul genomului; aceste proteine anormale se pot manifesta sub forma unor boli (boli moleculare).

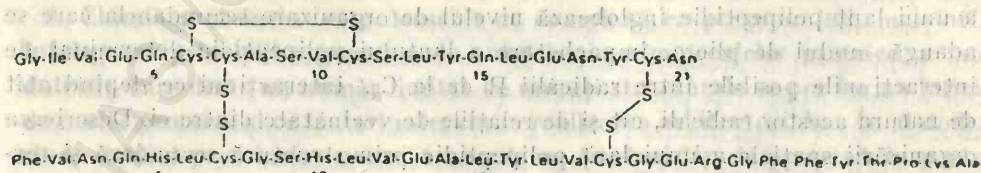
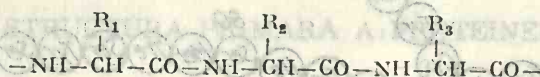


Fig. I.2 — Structura primară a insulinei





este un unicat în ceea ce privește structura primară și conformația. Din studiul conformațiilor unui număr de proteine se pot formula principiile generale care guvernează organizarea spațială a tuturor moleculelor proteice. Cele două elemente structurale ale unei proteine, axul catenei polipeptidice și cele 20 de tipuri de radicali legați la  $C_\alpha$  care se pot găsi într-o multitudine de relații reciproce contribuie la realizarea structurii secundare și terțiare a proteinelor.



### I.3.2.1. Structura secundară a proteinelor

Pauling și colab. începînd din anul 1930 au întreprins studii sistematice, prin cristalografie cu raze X, de măsurare a distanțelor interatomice, a unghiurilor de legătură din aminoacizi, din peptide. S-a stabilit că în gruparea peptidică are loc o conjugare  $\pi$  — p, legătura  $-NH-CO-$  capătă un caracter parțial de legătură dublă, rotația liberă în jurul acestei legături fiind astfel împiedicată. Atomii  $C_\alpha$  vor adopta poziții rigide față de planul legăturii duble. În peptidele naturale se întâlnește numai configurația trans, mai stabilă decît aceea cis (fig. I.4).

Lanțul peptidic își păstrează flexibilitatea prin rotația liberă în jurul legăturilor:

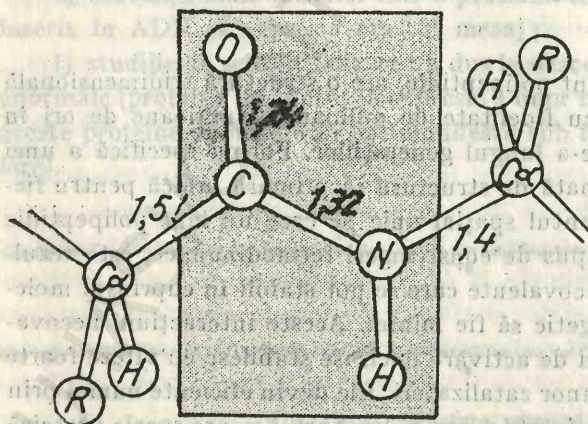
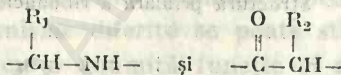


Fig. I.4 — Configurația trans a grupării peptidice.



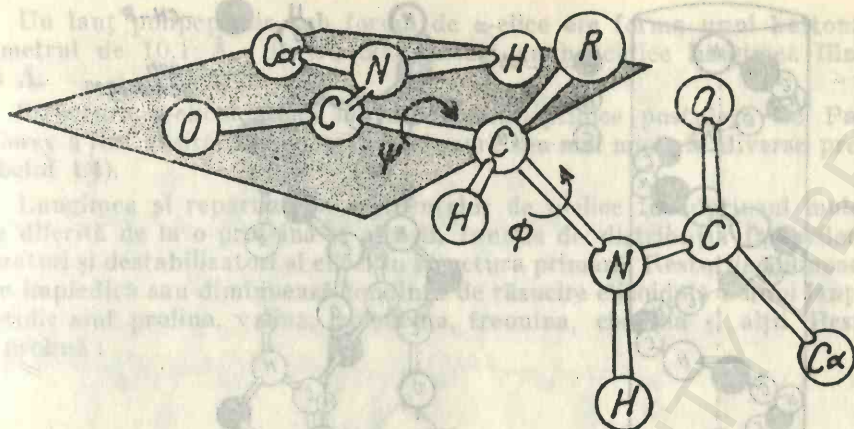
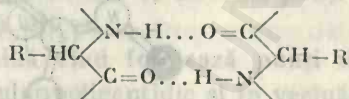


Fig. 1.5 — Rotația liberă a două planuri ce cuprind grupări peptidice.

Poziția a două planuri ce cuprind grupările peptidice este arătată în fig. 1.5.

O altă însușire a grupării peptidice este capacitatea grupei  $\text{>NH}$  de a forma o legătură de hidrogen cu un grup de  $\text{>C=O}$  aparținând altei grupări peptidice :



Conjugarea  $\pi$  — p a grupării peptidice accentuează această însușire.

Un lanț polipeptidic, în soluție, ar putea adopta o infinitate de conformații prin rotații în jurul legăturilor  $-\text{CH}(\text{R}_1)-\text{N}$  și  $-\text{CH}(\text{R}_2)-\text{CO}$ . Unele din aceste conformații vor fi mai stabile dacă permit realizarea de punți de hidrogen între grupările peptidice. Plecând de la principiul că aranjamentul cel mai stabil este acela în care se realizează cel mai mare număr de punți de hidrogen, Pauling și Corey (1951) au postulat două structuri secundare pentru lanțurile polipeptidice  $\alpha$  — elicea și structura  $\beta$ . O structură elicoidală distinctă de cea descrisă de Pauling este întâlnită la colagen, proteina majoră a matricei extracelulare, care are o compoziție aminoacidică particulară.

**Structura de elice alfa.** Lanțul polipeptidic se răsucește (la nivelul legăturilor simple) pentru ca grupările  $\text{O}=\text{C}$  și  $\text{>NH}$  să devină adiacente stereo-chimic pentru a forma punți de hidrogen. Se obține astfel o structură repetitivă elicoidală în care toate unitățile se află în raporturi spațiale identice cu unitățile vecine. O grupare  $\text{>NH}$  formează punte de hidrogen cu gruparea  $\text{>CO}$  aparținând celui de-al patrulea rest aminoacidic din secvența lineară. În acest fel toate grupele  $\text{>CO}$  și  $\text{>NH}$  sînt unite prin punți de hidrogen (fig. 1.6).



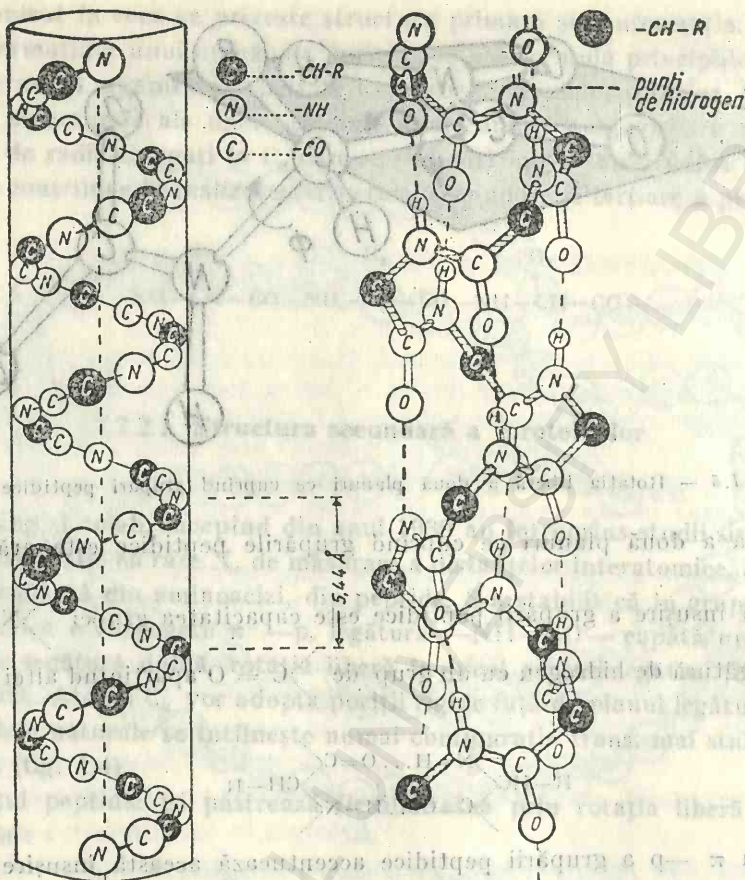


Fig. 1.6 — Structura de alfa-elice a unui lanț polipeptidic.

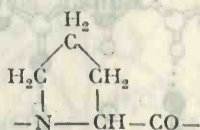
Stereochimia grupării peptidice, unghiurile de legătură, distanțele interatomice, colinearitatea punților de hidrogen, apartenența tuturor aminoacizilor la aceeași serie optică (seria L) determină o anumită geometrie a  $\alpha$ -elicei:

- cu fiecare rest aminoacidic se avansează pe verticală cu 1,47 Å;
- pasul elicei, distanța între două puncte echivalente pe verticală este de 5,21 Å și cuprinde 3,6 resturi aminoacidice;
- diametrul elicei, diametrul suprafeței cilindrice în care se află atomii  $C_{\alpha}$  este de 10,1 Å;
- sensul răsucirii lanțului polipeptidic este de la stînga la dreapta;
- radicalii R ai tuturor aminoacizilor sînt orientați spre exteriorul elicei, configurația atomilor  $C_{\alpha}$  este aceeași pentru toți aminoacizii;
- toate grupările  $>NH$  și  $>C=O$  formează punți de hidrogen.

Un lanț polipeptidic sub formă de  $\alpha$ -elice are forma unui bastonaș cu diametrul de 10,1 Å, pentru 300 resturi aminoacidice lungimea fiind de 450 Å.

Structura  $\alpha$ -elicoidală a lanțurilor polipeptidice postulată de Pauling și Corey a fost găsită, în proporție mai mare sau mai mică, la diverse proteine (tabelul I.4).

Lungimea și repartizarea segmentelor de  $\alpha$ -elice în cuprinsul moleculei este diferită de la o proteină la alta în funcție de distribuția factorilor stabilizatori și destabilizatori ai elicei în structura primară. Resturile aminoacidice care împiedică sau diminuează tendința de răsucire elicoidală a unui lanț polipeptidic sînt prolina, valina, izoleucina, treonina, cisteina și alții. Resturile de prolina :



prin structura lor particulară determină o îndoire cu  $130^\circ$  a lanțului polipeptidic, configurație care nu se mai acomodează cu geometria elicei. Prolina este aminoacidul care întrerupe răsucirea elicoidală a lanțurilor polipeptidice.

Resturile valină, izoleucină, treonină prin radicalii voluminoși de la  $\text{C}_\alpha$  determină o oarecare stîngenire sterică a elicei, ei fiind factori destabilizatori ai elicei și serina prin capacitatea de a forma punți de hidrogen prin gruparea alcoolică destabilizează elicea.

Resturile de cisteină cînd formează punți disulfurice leagă covalent, rigid, porțiuni ale lanțului polipeptidic și în vecinătatea acestor regiuni răsucirea elicoidală nu mai poate avea loc.

**Structura  $\beta$ .** O altă structură secundară a lanțurilor polipeptidice în care se realizează potențialul maxim de legare prin punți de hidrogen a grupărilor  $\text{>C=O}$  și  $\text{>NH}$  este structura  $\beta$  sau structura în foaie plisată. În acest caz punțile de hidrogen sînt intercatenare, lanțurile polipeptidice așezîndu-se în straturi. Cea mai stabilă intercațiune se obține dacă lanțurile evoluează unul de la capătul N-terminal spre cel C-terminal și celălalt în sens invers (structura  $\beta$  cu lanțuri antiparalele (fig. I.7). Datorită rigidității legăturii

peptidice și coplanarității grupului  $-\text{CH}-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}-$  se realizează structuri asemănătoare unei foi plisate. Radicalii R sînt orientați, alternativ, de o parte și de alta. Structura  $\beta$  este întilnită în proporție de 100% în fibroină, proteina din mătase, și în proporții variabile în alte proteine fibrilare. Structura  $\beta$  se întilnește însă și la proteine globulare, fie între segmente aparținînd la lanțuri diferite, fie într-un același lanț polipeptidic. Prin îndoirea în „ac de păr“ a unui lanț se realizează structura  $\beta$  cu lanțuri antiparalele. Acest element structural — denumit răsucire  $\beta$  — a fost găsit în numeroase proteine globulare, prin schimbarea bruscă a direcției lanțului polipeptidic.



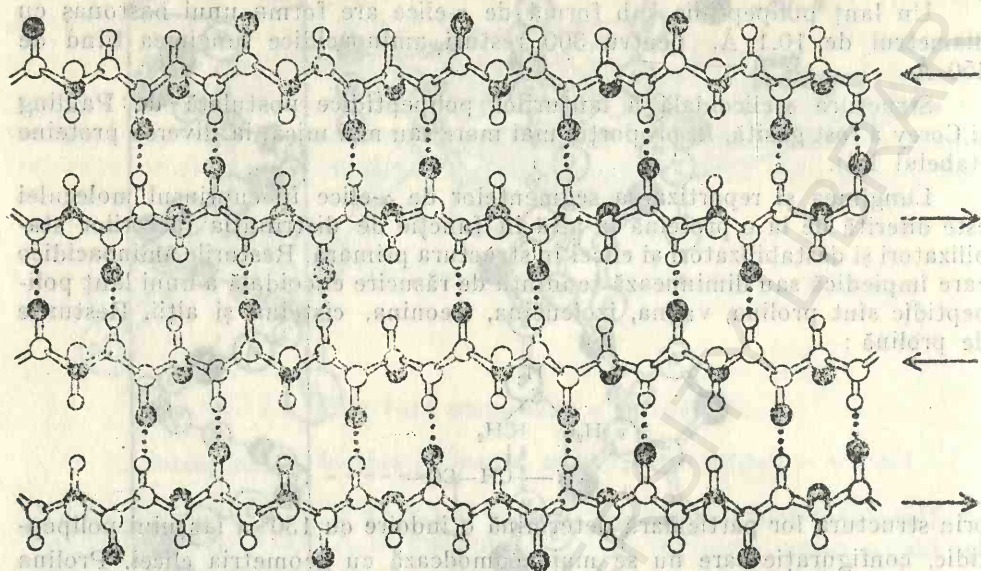


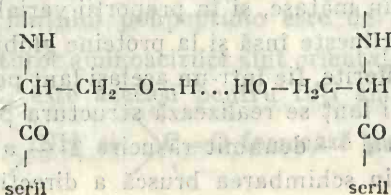
Fig. 1.7 — Structura secundară  $\beta$  cu lanțuri antiparalele a unui proteine.

### I.3.2.2. Structura terțiară a proteinelor

Acest nivel de organizare înglobează structura secundară și definește raporturile dintre segmentele de  $\alpha$ -elice și structura  $\beta$ ; modul de împachetare a lanțului polipeptidic. Factorii determinanți ai structurii terțiare ai unei proteine sînt interacțiunile necovalente între radicalii R de la  $C_{\alpha}$ , fie că aceștia se află în regiuni cu structură secundară  $\alpha$  sau  $\beta$ , fie că sînt cuprinși în segmente neorganizate. La nivelul de organizare terțiar moleculele proteice dobîndesc forma sa specifică.

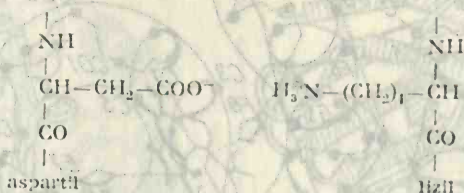
Între diverșii radicali ai aminoacizilor se pot stabili următoarele tipuri de legături necovalente:

— punți de hidrogen între radicalii cu grupări alcoolice (din resturi seril, treonil), fenolice (din resturi tirozil), amidice (din resturi glutaminil și asparaginil);

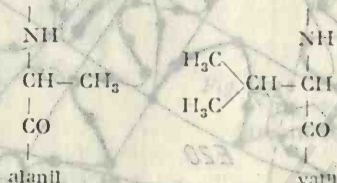




— legături ionice, saline, între radicalii cu sarcină negativă (din resturi lizil, arginil, histidil) sau interacțiuni polare între radicalii polari, fără sarcini :



— interacțiuni hidrofobe între resturile aminoacizilor nepolari ca valină, leucină, izoleucină, fenilalanină, alanină :



Resturile cisteinil din multe proteine formează legături disulfurice care leagă covalent regiuni mai depărtate ale lanțurilor polipeptidice. Pozițiile acestor legături depind și de totalitatea factorilor care asigură conformația nativă a proteinei. Ribonucleaza (104 resturi aminoacidice) cuprinde patru punți disulfurice între resturile  $\text{Cis}_{26}-\text{Cis}_{84}$ ,  $\text{Cis}_{40}-\text{Cis}_{95}$ ,  $\text{Cis}_{58}-\text{Cis}_{110}$  și  $\text{Cis}_{65}-\text{Cis}_{72}$ . Din multitudinea de combinații posibile între cele 8 resturi cisteinil în proteina nativă se realizează una singură (fig. 1.3).

Un lanț polipeptidic adoptă, în măsura în care îi permite structura sa primară, configurații de  $\alpha$ -elice și de structură  $\beta$  și prin pliere, împachetarea lanțului caută să satisfacă și afinitățile radicalilor R. Rezultanta tuturor acestor interacțiuni determină conformația moleculei proteice. Această conformație este de fapt un compromis — nu se pot realiza toate legăturile de hidrogen posibile, nu toate porțiunile nepolare ajung să fie inconjurate de un mediu pur hidrofof, nu orice grupare (—) ajunge în vecinătatea uneia (+), dar este compromisul cel mai favorabil din punct de vedere energetic, cel mai stabil. Factorul ultim care determină conformația unei proteine este structura sa primară. Informația genetică tradusă în secvențe de aminoacizi, prin jocul forțelor fizico-chimice, se transformă spontan în edificii tridimensionale specifice.

Prima proteină a cărei structură tridimensională a fost stabilită în cele mai mici detalii, precizându-se poziția în spațiu a tuturor atomilor componenți este mioglobina (Kendrew și colab. 1957). Mioglobina este o proteină abundentă în mușchi, în special la mamiferele eufundătoare (balenă, cașalot), având rolul de transportor tisular de oxigen. Această proteină cuprinde aproximativ 150 aminoacizi (mioglobina din mușchiul de cașalot are în compoziție 153) și o grupare neproteică denumită hem. În fig. 1.8 se arată schematic conformația moleculei de mioglobină.

În mioglobină 75% din lanțul polipeptidic formează  $\alpha$ -elice. Cuprinde 8 segmente elicoidale (denumite A, B, ..., H) cuprinzând între 7 (segmentul D)

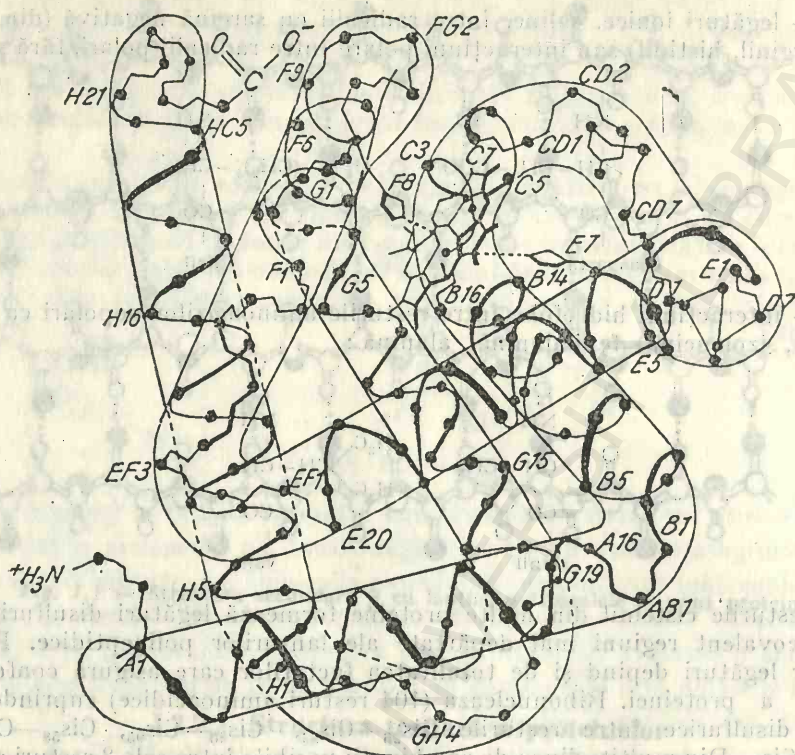


Fig. 1.8 — Structura terțiară a mioglobinei.

și 24 resturi aminoacidice (segmentul H). Regiunile elicoidale sînt separate de segmente necicoidale la nivelul cărora lanțul polipeptidic își schimbă direcția. În patru puncte de terminare a elicelor se află prolina. În celelalte regiuni întreruperea răsucirii elicoidale este determinată de alți factori. Prin aceste schimbări ale direcției lanțului polipeptidic molecula devine extrem de compactă ( $45 \times 35 \times 25$  Å). Interiorul moleculei cuprinde numai aminoacizi cu R nepolar cu excepția a două resturi histidil angajate în legarea grupării hem. Resturile treonil și tirozil au grupările hidroxilice orientate superficial, în timp ce porțiunile nepolare ale acestor aminoacizi sînt îngropate în interior. Suprafața externă a moleculei cuprinde toate resturile polare, și cu sarcină electrică, presărate printre radicali nepolari.

În general proteinele intracelulare, solubile, au etalate pe suprafața moleculei grupările polare și încărcate. Formă sferică sau elipsoidală a moleculei depinde de raportul dintre numărul resturilor aminoacidice cu R încărcat și numărul resturilor cu R hidrofob. O valoare mai mare a raportului (0,9—1,4) favorizează adoptarea unei forme mai alungite. O proteină cu un raport număr R încărcat/număr R hidrofob mic (0,3—0,6) adoptă o formă sferoidală, resturile nepolare, hidrofobe se acumodează mai ușor în centrul unei structuri globulare decît al uneia cilindrice.

La proteinele membranare înglobate în stratul dublu lipidic, repartizarea resturilor aminoacidice polare și nepolare este inversă. Partea exterioară a



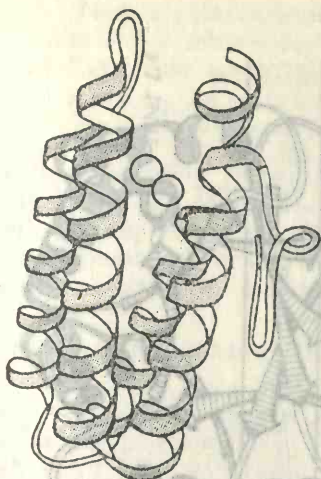


Fig. 1.9 — Structura unei proteine all- $\alpha$  (miohemeritrică).

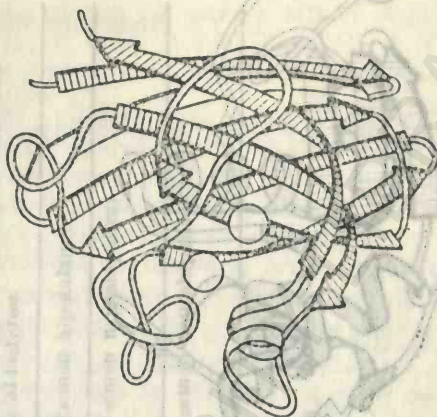


Fig. 1.10 — Structura unei proteine all- $\beta$  (Cu, Zn-superoxid dismutază). Structura  $\beta$  este redată prin săgeți.

moleculii, în contact cu lipidele membranare, cuprinde radicalii hidrofobi, iar în interiorul moleculei se delimitează canale căptușite cu resturi amino-acidice polare și încărcate electric (canale ionice).

Numărul proteinelor cu structură terțiară cunoscută este în continuă creștere și analiza acestor structuri dovedește păstrarea trăsăturilor calitative dar cu o mare plasticitate în detalii. Structura terțiară, spre deosebire de cea secundară, este determinată de elemente nerepetitive, totuși și la acest nivel au fost recunoscute câteva scheme de organizare spațială. Această a permis clasificarea proteinelor globulare în câteva clase:

— proteine all- $\alpha$ , lanțul polipeptidic are structură secundară de  $\alpha$ -elice, în proporții de aproape 100% și elicele sînt împachetate într-o formă compactă, globulară (Fig. 1.9);

— proteine all- $\beta$ , lanțul polipeptidic prin îndoire formează structuri  $\beta$  cu lanțuri antiparalele, așezate unele lângă altele (Fig. 1.10);

— proteine  $\alpha + \beta$ , segmentele cu organizare secundară  $\alpha$  și  $\beta$  sînt segregate în structura terțiară (Fig. 1.11);

— proteine  $\alpha/\beta$ , segmentele  $\alpha$  și  $\beta$  alternează în structura terțiară (Fig. 1.12);

— proteine fără organizare secundară  $\alpha$  sau  $\beta$ , plierea lanțului este hotărîtă numai de interacțiunile între R (coil proteins); în general sînt proteine mici ce cuprind un număr relativ mare de punți disulfurice.

#### Organizarea pe domenii a proteinelor

După recunoașterea unor scheme structurale la nivelul organizării terțiare a moleculelor proteice, un concept nou care permite o mai bună înțelegere a raporturilor dintre structura și funcțiile unei proteine este conceptul organizării proteinelor mai complexe pe domenii structurale. Prin domenii structurale ale unei proteine se înțeleg regiuni compacte cu organizarea terțiară



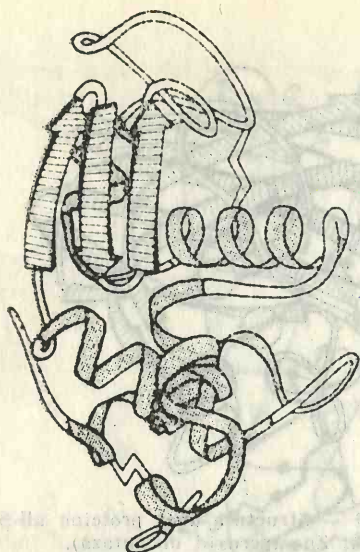


Fig. 1.11. — Structura unei proteine  $\alpha+\beta$  (lizozim). Structura  $\beta$  este redată prin săgeți.

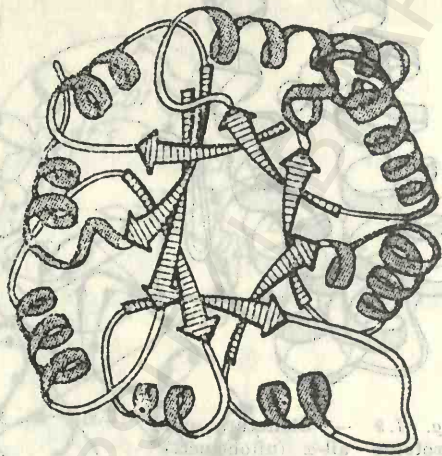


Fig. 1.12 — Structura unei proteine  $\alpha/\beta$  (triozofosfat izomerază). Structura  $\beta$  este redată prin săgeți.

specifică, relativ rigide, serarate între ele de segmente mai puțin organizate care permit mișcarea unui domeniu în raport cu altul (dinamica domeniilor). Fiecare domeniu structural al unei proteine este răspunzător de o anumită funcție. Gradul de flexibilitate al domeniilor variază de la mișcări mai ample la altele restrinse, depinzând de natura segmentelor interdomenii.

La imunoglobuline există două domenii de legare a antigenului care se pot deplasa la nivelul unor regiuni balama încit pot interacționa cu grupări determinante din antigene care au diferite orientări relative. La enzime, centrele active sînt situate la interfața dintre două domenii și fixarea substratului induce deplasări relative ale domeniilor cu schimburi propice procesului catalitic (spre exemplu, excluderea apei din centrul activ).

Un aspect de cea mai mare importanță care a rezultat din dezvoltarea conceptului de organizare pe domenii a proteinelor este acela că domenii cu structuri și proprietăți asociative similare sînt prezente în proteine diferite. Complexitatea structurilor și funcțiilor proteinelor poate rezulta prin asocierea de domenii structurale diferite (construcție modulară).

Construcția proteinelor complexe din module funcționale independente conferă proteinelor potențialități noi. De exemplu, subunitatea R (reglatoare) a protein-kinazei A, de la mamifere, este similară cu un domeniu al proteinei CAP (catabolite activator protein) de la *E. coli*. Aceste două domenii au funcția de a recunoaște și a fixa  $AMP_c$ . Prin prezența acestui domeniu la proteine diferite și de la specii foarte depărtate, este posibilă exercitarea unor roluri reglatoare de către  $AMP_c$  (cap. XII). Organizarea pe domenii este întâlnită la unele enzime solubile, fiecare domeniu catalizează o etapă dintr-o secvență metabolică. Eficiența crește foarte mult deoarece este împiedicată pierderea intermediarilor în reacții colaterale, procesul desfășurându-se în flux continuu.

Tabel 1.5

## Oligopeptide cu funcții biologice

Denumirea	Structura	Funcție
Carnozină	-Ala-His	Component al mușchilor, Funcție?
Glutatin	-Glu-Cys-Gly <sup>a</sup>	Agent redox intracelular
Bradikinină	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg	Agent hipotensiv
Angiotensina II	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe	Agent hipotensiv, reglează secreția de aldosteron
TSH - RH	Piro-Glu-His-Pro-amidă <sup>b</sup>	Hormon hipotalamic
Ocitocină	Cys-Tyr-Ile-Glu-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-amidă <sup>c</sup>	Hormon neurohipofizar
Vasopresina	Cys-Tyr-Phe-Glu-Asn-Cys-Pro-Leu(Arg)-Glu-amidă <sup>c</sup>	Hormon neurohipofizar

- a) Restul Glu N-terminal este angajat în legătura peptidică prin gruparea  $\gamma$ -COOH.  
 b) Restul Glu N-terminal formează amidă internă; restul Pro C-terminal formează amidă.  
 c) Resturile 10 Cys și 6 Cys formează punte disulfurică; resturile Gly C-terminal formează amidă.



### 1.3.2.3. Structura cuaternară a proteinelor

Multe proteine sînt alcătuite din mai multe lanțuri polipeptidice, de regulă un număr mic și pereche (proteine oligomere) (Tabel 1.6). Lanțurile individuale sînt denumite protomeri sau subunități. La aceste proteine pe lângă structurile primară, secundară și terțiară ale fiecărui protomer, apare un nivel superior de organizare — structura cuaternară. Aceasta definește natura, numărul și modul de asociere a protomerilor.

Funcția specifică a unei proteine oligomere se manifestă numai la nivelul structurii cuaternare, protomerii separați sînt inactivi.

Asamblarea protomerilor, structura cuaternară, se realizează numai prin forțe slabe necovalente și asocierea devine stabilă, permanentă, numai dacă suprafețele de contact sînt complementare și un număr cît mai mare de atomi se apropie pînă la nivelul razelor lor van der Waals (raze de contact). Complementaritatea suprafețelor de contact asigură un grad foarte înalt de exactitate și de specificitate a structurilor cuaternare. Protomerii unor proteine omologe de la specii diferite nu se asociază.

Interacțiunile prin suprafețe complementare prezintă fenomenul de cooperare, adică primele interacțiuni favorizează formarea celorlalte. La început moleculele se juxtapun prin cîteva puncte, după care celelalte grupări își găsesc mai ușor partenerii.

Capacitatea de interacțiune a moleculelor prin suprafețe complementare explică nu numai formarea proteinelor oligomere, a unor structuri supramoleculare, dar și modul în care proteinele își îndeplinesc funcțiile caracteristice, de transport etc.

Structurile cuaternare permit funcționarea unor mecanisme fine de reglare a activității proteinelor. O perturbație care are loc la nivelul unui protomer (de exemplu combinarea sa cu un compus oarecare) poate fi transmisă în restul moleculei, fiind resimțită la nivelul contactului dintre protomeri, structura cuaternară este alterată și totodată și funcția proteinei. Acest mecanism de reglare este denumit reglare alosterică, ce va fi dezvoltat în capitolul de enzime.

Tabel 1.7

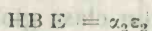
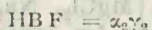
Proteine oligomere

Proteina	Masa proteinei Kdaltoni	Nr. protomeri	Masa protomerilor Kdaltoni
Miozină	468	2	212
Creatin kinază	80	2	40
Fosfatază alcalină	80	2	40
Hemoglobină	64,5	4	16
Lactat dehidrogenază	150	4	35
Aldolază	160	4	40
Glicogen fosforilază	270	4	92,5
Piruvat kinază	237	4	57,2
Ceruloplasmină	151	8	18
Glutamin sintetază	592	12	48,5



Hemoglobina este o proteină oligomeră. Hematiile normale cuprind mai multe specii moleculare de hemoglobină. Componenta principală din singele adultului este hemoglobina A<sub>1</sub>, (Hb A<sub>1</sub>) alături de care se află în cantitate mică Hb A<sub>2</sub>. La embrion există o Hb E, iar la făt și nou-născut Hb F. Toate speciile de hemoglobină cuprind patru lanțuri polipeptidice de câte două tipuri  $\alpha$  și  $\beta$ . Hemoglobina A<sub>1</sub> are structura  $\alpha_2\beta_2$ .

Celelalte specii de hemoglobină cuprind în locul lanțurilor  $\beta$ , lanțuri  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ :



Fiecare protomer este legat de câte o grupare hem și activitatea de transport a oxigenului se manifestă numai la nivelul tetramerului.

Lanțul  $\alpha$  cuprinde 141 resturi aminoacidice, iar cel  $\beta$ , 146 resturi. Structurile terțiare ale acestor lanțuri sînt similare cu ale mioglobinei, cu care are similitudini și de compoziție aminoacidică. În fig. 1.13 este arătată structura cuaternară a hemoglobinei. Un lanț  $\alpha$  este asociat de cele două lanțuri  $\beta$  prin zone de contact diferite  $\alpha_1\beta_1$  și  $\alpha_1\beta_2$ . Contactele între protomeri identici  $\alpha\alpha$  și  $\beta\beta$  sînt foarte reduse. Contactul  $\alpha_1\beta_2$  este cel mai întins în spațiu, fiind implicate 34 resturi aminoacidice și aduc în contact 110 atomi. Forțele principale de legare sînt interacțiunile hidrofobe. Al doilea contact,  $\alpha_1\beta_1$  mai restrîns, aduce în vecinătate 80 atomi aparținînd la 19 resturi aminoacidice. Datorită acestui contact, mai slab, hemoglobina se disociază, în condițiuni favorabile, mai întîi în dimeri  $\alpha\beta$  și apoi sînt eliberați protomerii :

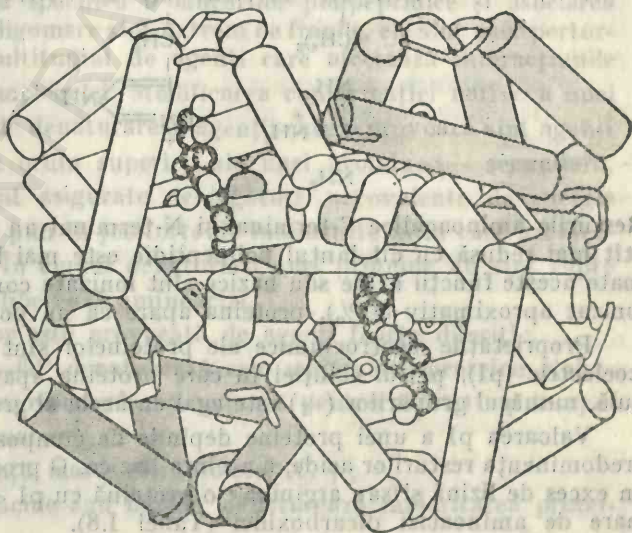
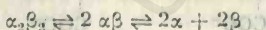


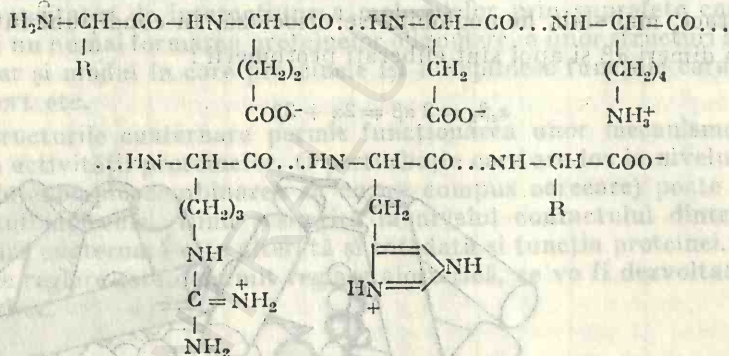
Fig. 1.13 — Structura cuaternară a hemoglobinei. Regiunile elicoidale sînt redatate prin cilindri.

### I.3.3. PROPRIETĂȚILE GENERALE ALE PROTEINELOR

**Solubilitatea.** Proteinele fibrilare sînt insolubile în apă, pe cînd cele globulare prezintă grade diferite de solubilitate. Această însușire este datorată repartizării pe suprafața moleculelor de resturi aminoacidice cu sarcini electrice și a acelor care cuprind grupări polare.

Solubilitatea în apă a proteinelor este puternic influențată de pH-ul mediului prin modificarea încărcării electrice a proteinei. De asemenea diverse săruri ale metalelor ușoare, NaCl, MgCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, influențează considerabil solubilitatea proteinelor. La concentrații mici ele au un efect favorabil. De exemplu proteinele din clasa globulinelor sînt greu solubile în apă pură, ele se dizolvă ușor numai în soluții saline diluate. La concentrații foarte mari sărurile amintite scad solubilitatea proteinelor pînă la precipitarea lor din soluție (salifiere). Albuminele și globulinele se deosebesc după ușurința cu care sînt precipitate de către sulfatul de amoniu. Globulinele precipită cînd soluțiile care le cuprind sînt aproximativ semisaturate în (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pe cînd albuminele precipită la concentrații mai mari de 75% saturatie. Precipitarea fracționată a proteinelor din soluție prin adăugarea treptată de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> este o metodă cu largi utilizări pentru separarea proteinelor din medii biologice complexe.

**Proprietățile electrochimice.** Proteinele sînt amfoliți macromoleculari, cuprinzînd un număr mai mare sau mai mic de grupări acide și bazice. Contribuția cea mai importantă o au resturile glutamil, aspartil, lizil, arginil și histidil:



Resturile aminoacidice C-terminal și N-terminal au o contribuție redusă, cu atît mai redusă cu cît lanțul polipeptidic este mai lung. La pH-ul fiziologic toate aceste funcții acide sau bazice sînt ionizate complet (restul histidil este ionizat aproximativ 50%), proteina apare ca un poliamfolit.

Proprietățile electrochimice ale proteinelor sînt concretizate prin pH-ul izoelectric (pI), pH-ul soluției în care proteina apare cu o sarcină electrică nulă, numărul grupărilor (+) este egal cu acela al grupărilor (—).

Valoarea pI a unei proteine depinde de compoziția sa aminoacidică, de predominanța resturilor acide, a acelor bazice. O proteină cu pI > 7 cuprinde un exces de lizină și/sau arginină : o proteină cu pI < 7 cuprinde o proporție mare de aminoacizi dicarboxilici (Tabel I.8).

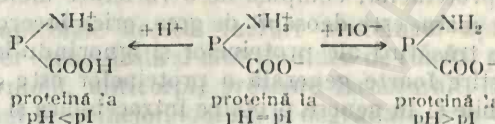


Tabel 1.8

## pH-urile izoelectrice p(I) ale unor proteine

Proteina	pI
Salmină	12,1
Histonă	10,8
Serum albumină	4,9
Miozină	5,2
Fibrinogen	5,5
Tireoglobulină	4,58
Lizozim	11
Mioglobină	6,99
Hemoglobină	7,07
Citocrom c	9,8
Insulină	5,35
Pepsină	ec 1

La pH-ul izoelectric solubilitatea, mobilitatea proteinei în câmpuri electrice este minimă. La pH-uri depărtate de pI o proteină are o încărcătură netă (+) sau (—):



Sub formă de anioni sau cationi proteinele migrează în câmpuri electrice, proprietate care stă la baza metodelor electroforetice de separare a proteinelor din amestecuri.

**Denaturarea proteinelor.** Conformațiile native ale proteinelor globulare, rezultate prin împerecherea specifică a lanțurilor polipeptidice și asocierea subunităților în proteinele oligomere sînt extrem de fragile, ele sînt ușor perturbate sub acțiunea unei multitudini de agenți care afectează interacțiunile necovalente din cuprinsul moleculei. Modificarea conformației native a unei proteine poartă denumirea de denaturare și agenții care o provoacă sînt agenți denaturanți. Structurile de ordin superior ale unei proteine — secundară, terțiară, cuaternară — sînt asigurate de legături necovalente de energie joasă și agenții denaturanți pun în joc forțe de intensitate mică care nu afectează legăturile covalente. În cursul denaturării unei proteine nu sînt rupte legăturile peptidice, nu se eliberează aminoacizi.

Denaturarea proteinelor este provocată de agenți foarte diferiți:

- temperaturi de 50—60° denaturează cele mai multe proteine globulare; puține proteine, de ex. ribonucleaza, suportă pentru scurt timp temperaturi de 100° fără a se denatura;
- radiațiile cu frecvență mare, ultraviolete, X,  $\gamma$ ;
- pH-urile extreme, acide sau bazice, denaturează majoritatea proteinelor;

- ureea și guanidina, în concentrații mari denaturează, reversibil, majoritatea proteinelor solubile;
- agenții tensioactivi (surfactanții);
- solvenții organici.

Acțiunea denaturantă a ureei și guanidinei, compuși cu o capacitate foarte mare de a contracta legături de hidrogen, demonstrează rolul acestor interacțiuni la stabilizarea conformației unei proteine. Acțiunea acestor agenți este ușor reversibilă; după îndepărtarea ureei sau a guanidinei, legăturile de hidrogen se reconstituie în cuprinsul moleculei proteice în același număr și în aceleași poziții ca în proteina nativă. Denaturarea proteinelor sub acțiunea agenților tensioactivi sau a solvenților organici demonstrează rolul interacțiunilor hidrofobe, în realizarea conformației native a unei proteine. Acizii și bazele modifică încărcarea electrică a unor grupări, schimbă raporturile de vecinătate între sarcinile + și - de pe suprafața moleculei.

### 1.3.4. CLASIFICAREA PROTEINELOR

Sistematizarea proteinelor, compuși de o varietate moleculară și funcțională extraordinar de mare, este deosebit de grea, orice încercare este arbitrară bazându-se pe unele trăsături ale proteinelor și ignorându-le pe altele.

O primă împărțire foarte generală a proteinelor este aceea în proteine globulare, ușor solubile și, în genere, proteine intracelulare și proteine fibrilare, insolubile, de regulă proteine extracelulare, cu roluri de susținere.

Un alt criteriu de clasificare a proteinelor este prezența sau absența în moleculă a unei grupări chimice distincte de lanțul polipeptidic, denumită grupare prostetică. Pe această bază proteinele sunt clasificate în proteine simple (holoproteine), alcătuite numai din aminoacizi și proteine conjugate (heteroproteine) alcătuite dintr-o proteină (apoproteină) și o grupare prostetică. După natura grupării prostetice se deosebesc următoarele clase de proteine.

*Fosfoproteinele* au gruparea prostetică constituită din restul fosforil (- $\text{PO}_3\text{H}_2$ ) legat esteric la grupările hidroxilice ale resturilor seril, treonil sau tirozil.

Unele proteine cuprind permanent resturi fosforil (de ex. cazeina), pe cînd altele oscilează între forme fosforilate și defosforilate (proteine interconvertibile). Schimbarea gradului de fosforilare al unei proteine face parte dintr-un mecanism general de reglare al funcțiilor proteinelor (vezi capitolul enzime, hormoni).

*Glicoproteinele* sînt proteine ce cuprind unități monozaharidice sau oligozaharidice atașate de lanțul polipeptidic. Proteinele din membrana plasmatică cele care cîmpușesc diverse cavități sînt bogate în resturi glucidice. Un număr redus de glucide este prezent în mai toate proteinele.

*Lipoproteinele* sînt asociații între proteine (apolipoproteine) și una sau mai multe grupe de lipide amfipatice. Asocierile predominant necovalente sînt totuși suficient de stabile și specifice, lipoproteinele existînd ca entități structurale de sine stătătoare. În plasmă există mai multe grupe de lipoproteine (chilomicroni,  $\alpha$ - și  $\beta$ -lipoproteine).



**Cromoproteinele** sînt proteine colorate din cauza grupării prostetice pe care o cuprind. Subclasa hemoproteinelor, proteine a căror grupare prostetică este hemul, cuprinde hemoglobina și mioglobina; proteine transportoare de oxigen, citocromii; proteine transportoare de electroni. O altă subclasă de cromoproteine sînt flavoproteinele, proteine colorate în galben. Cuprind drept grupare prostetică o structură derivată de la vitamina B<sub>2</sub> (riboflavina). Flavoproteinele funcționează ca transportori de hidrogen.

**Metaloproteinele**, proteine care cuprind ioni metalici sau combinații simple ale metalelor asociate direct cu apoproteina. Feritina, proteina de depozitare a fierului este alcătuită din apoferitină și ioni de fier; ceruloplasmina este o proteină ce cuprinde ioni de cupru.

**Nucleoproteinele** sînt alcătuite din acizii nucleici și proteine, în genere proteine bazice, asociate prin legături salin.

Aceeași proteină poate cuprinde mai multe tipuri de grupări prostetice, însumînd caracterele mai multor clase de proteine conjugate, fosfo- și glicoproteine, glico- și metaloproteine etc.

Un alt mod de a sistematiza studiul proteinelor este acela care are în vedere funcțiile pe care le îndeplinesc: proteine enzimatic, proteine contractile, proteine hormonale, proteine de transport etc., sau după origine: proteine plasmatic, proteine eritrocitare, proteine hepatice etc.

În toate capitolele acestei lucrări proteinele apar ca figuri centrale prin varietatea lor structurală și multitudinea de funcții pe care le îndeplinesc: catalizatori, hormoni, anticorpi, proteine structurale, contractile etc.

Metabolismul proteinelor, sinteză și degradare, vor fi tratate în cap. VI unde sînt prezentate mecanismele moleculare de legare a aminoacizilor în succesiuni dictate de informația genetică cuprinsă în ADN, și în cap. IX care cuprinde căile de biosinteză și de catabolizare ale aminoacizilor.

În prezent se știe că reacțiile chimice care intermediează procesul de sinteză a proteinelor sînt catalizate de enzime. Acestea sînt molecule proteice care accelerează reacțiile chimice și reduc energia de activare a acestora. Enzimele sînt prezente în toate celulele și sînt responsabile pentru majoritatea proceselor metabolice care au loc în organism. Ele sînt foarte specifice, fiecare enzimă catalizînd doar o singură reacție chimică sau un tip de reacție. Activitatea enzimatică este influențată de factori precum temperatura, pH-ul și prezența anumitor cofactori. Studiul enzimelor este esențial pentru înțelegerea mecanismelor biologice și pentru dezvoltarea de noi medicamente și tehnologii industriale.

## U.S. ENERGIA DE ACTIVARE A REACȚIILOR CATALIZATE DE ENZIME

În studiul nostru sînt prezentate rezultatele unei cercetări privind energia de activare a reacțiilor catalizate de enzime. Scopul principal al lucrării este de a determina energia de activare pentru o serie de reacții chimice catalizate de enzime specifice. Pentru aceasta sînt utilizate metode avansate de măsurare a vitezei de reacție în funcție de concentrația reactanților și de temperatura sistemului. Rezultatele obținute sînt comparate cu valorile teoretice calculate pe baza teoriei de tranziție, ceea ce permite o înțelegere mai profundă a mecanismului de acțiune al enzimelor. Aceste date sînt deosebit de importante pentru înțelegerea rolului enzimelor în procesele biologice și pentru optimizarea condițiilor de reacție în aplicații industriale.

## Cap. II. ENZIMELE

### II.1. INTRODUCERE

Un număr mare de proteine și heteroproteine au rolul de a cataliza reacțiile chimice ce au loc în organismele vii. Ele se numesc biocatalizatori sau enzime, fiind produse, ca toate proteinele, de însuși organismul viu. Termenul „enzimă“ înseamnă (în limba greacă) „în drojdie“, el fiind introdus pe la mijlocul secolului trecut, perioadă când s-au efectuat primele cercetări privitoare la cataliza reacțiilor în lumea vie și care priveau procesele fermentative în totalitate. Printre pionierii acestor studii se numără și Pasteur ale cărui contribuții importante, și în acest domeniu, au fost însă umbrite de elaborarea conceptului că enzimele acționează numai în celule, concept pe larg speculat la vremea respectivă de teoriile vitaliste.

În anul 1897 s-a demonstrat că „sucurile“ obținute prin spargerea celulelor păstrează activitatea enzimatică a celulelor din care au fost obținute. Deși multe din însușirile enzimelor au fost studiate pe aceste sucuri, epoca modernă a enzimologiei începe odată cu izolarea, purificarea și cristalizarea primelor enzime : ureaza (în anul 1926), pepsina, tripsina, chimotripsina etc.

În prezent se știe că reacțiile chimice prin intermediul cărora se realizează procese fundamentale în lumea vie cum sînt metabolismul, dezvoltarea, reproducerea sînt, cu rare excepții, reacții catalizate.

Cunoașterea repartiției enzimelor în celule, structurilor lor intime, mecanismelor prin care ele catalizează reacțiile, modului de sinteză și degradare a constituit suportul dezvoltării extrem de rapide a biochimiei ; fără aceste cunoștințe nu ar fi fost posibile, salturile spectaculoase în genetică și ingineria genetică, explicarea mecanismului producerii multor boli, a modului de acțiune a medicamentelor, perfecționarea metodologiei de diagnostic etc.

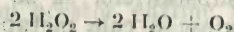
### II.2. ENERGIA DE ACTIVARE A REACȚIILOR CATALIZATE DE ENZIME

Însușirile generale ale catalizatorilor se regăsesc și la enzime ; ele acționează în concentrații foarte mici, nu modifică echilibrul reacțiilor catalizate ci grăbesc numai atingerea acestuia, participă direct la reacții dar se refac, regăsindu-se integral la sfîrșit. Ca și catalizatorii, enzimele asigură



viteze mult mai mari ale reacțiilor, ca urmare a scăderii energiei de activare. Comparînd, pentru cazurile cînd este posibil, eficacitatea în scăderea energiei de activare a catalizatorilor chimici în raport cu enzimele se constată o netă superioritate a celor din urmă.

Un exemplu îl constituie reacția de descompunere a apei oxigenate :



Deși este exergonică, la temperatura camerei și în lipsa catalizatorului, reacția se desfășoară cu viteză mică; explicația este că la această temperatură numai un număr mic de molecule au energia necesară pentru formarea „complexului de tranziție”, stare ce condiționează orice transformare chimică. Pentru a aduce toate moleculele la starea energetică corespunzătoare formării complexului de tranziție este necesar ca sistemul să primească energie din exterior, de regulă sub formă de căldură. Energia de activare ( $E_a$ ) se definește drept cantitatea de energie necesară unui mol de substrat (în cazul dat  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) pentru ca toate moleculele acestuia să atingă starea de tranziție.

Fără catalizator, energia de activare a  $\text{H}_2\text{O}_2$  este de 18 kcal/mol (fig. 11.1). Pe figură se redă scăderea  $E_a$  în prezența Pt coloidale (11,7 kcal/mol) și a enzimei specifice numită catalază (5,5 kcal/mol). În cazul discutat, și în toate reacțiile catalizate, scăderea  $E_a$  se explică prin cursul diferit imprimat acestora de către catalizator (enzimă), așa cum va reieși din cele ce urmează.

Diminuarea la valori minime a energiei de activare în reacțiile catalizate de enzime este în cele din urmă factorul care asigură desfășurarea reacțiilor în organismele vii la care temperatura internă este constantă. Ea explică totodată marea capacitate catalitică a enzimelor; în general, viteza reacțiilor catalizate de enzime este de  $10^3 - 10^6$  (uneori  $10^9 - 10^{11}$ ) ori mai mare decât a reacțiilor corespunzătoare necatalizate.

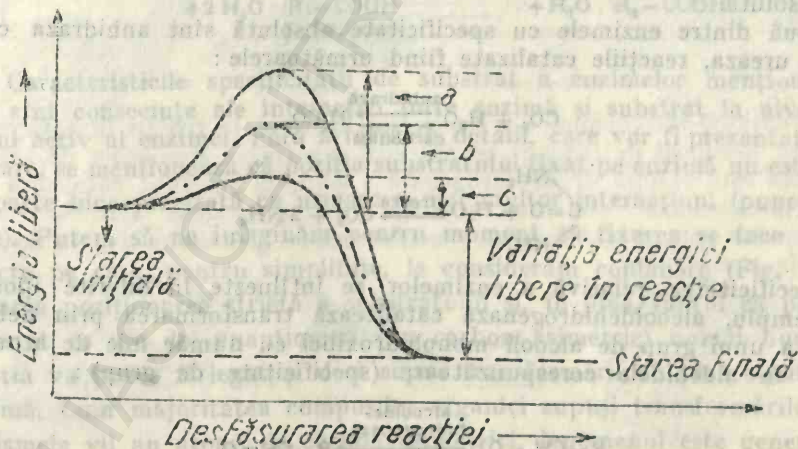


Fig. 11.1 — Energia de activare pentru descompunerea apei oxigenate:  
a) fără catalizator; b) în prezența Pt coloidale; c) în prezența catalazei.

### II.3. SPECIFICITATEA ENZIMELOR

Înalta specificitate a enzimelor este unul din atributele lor fundamentale. Acesta este elementul care face ca în celule, din multitudinea de posibilități de transformare a substanțelor să se realizeze numai unele; succesiunea reacțiilor care alcătuiesc o cale metabolică are ca fundament tot mai specificitatea de acțiune a enzimelor.

Multitudinea formelor de manifestare a specificității enzimelor poate fi încadrată în două categorii: specificitatea de reacție și specificitatea de substrat.

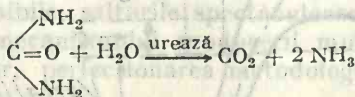
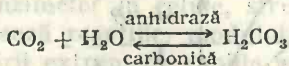
*Specificitatea de reacție* este capacitatea fiecărei enzime de a cataliza un anumit tip de reacție. Această specificitate stă la baza clasificării enzimelor, cum se va vedea în continuare. Tipul de reacție catalizat de unele enzime este de oxidoreducere (oxidoreductaze), altele asigură transferul unor grupări (transferazele), reacții de hidroliză (hidrolazele) etc.

În cadrul tipului de reacție aria de acțiune este specializată. De exemplu există transferaze foarte diverse: aminotransferaze, fosfotransferaze, metiltransferaze etc.

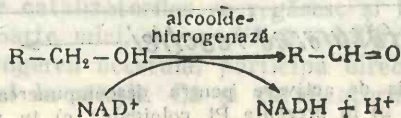
Există și unele excepții: din mușchiul cardiac de porc s-a izolat o enzimă care are atât activitate de tip oxidoreductazic (transformarea reversibilă oxaloacetat  $\rightleftharpoons$  L-malat) cât și de tip aminotransferazic (asemănătoare acțiunii glutamat-oxaloacetat aminotransferazei). Se citează unele enzime care au chiar mai mult de două variante de specificitate de reacție. Foarte probabil, astfel de enzime posedă centre active distincte pentru fiecare tip de reacție.

*Specificitatea de substrat.* O enzimă cu o anumită specificitate de reacție poate asigura transformarea corespunzătoare a unui grup de substanțe (evident înrudite chimic), specificitatea numindu-se relativă; dacă reacția catalizată de enzimă se restrânge la un substrat unic specificitatea enzimei este absolută.

Două dintre enzimele cu specificitate absolută sînt anhidraza carbonică și ureaza, reacțiile catalizate fiind următoarele:



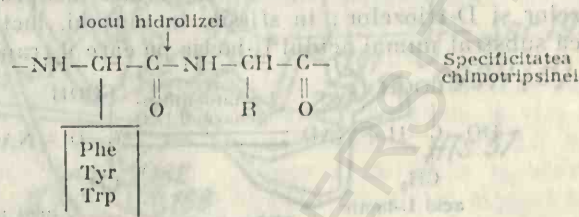
Specificitatea relativă a enzimelor se întâlnește în diferite ipostaze. De exemplu, alcooldehidrogenaza catalizează transformarea prin dehidrogenare a unui grup de alcooli monohidroxilici cu număr mic de atomi de carbon în aldehidele corespunzătoare (specificitate de grup):



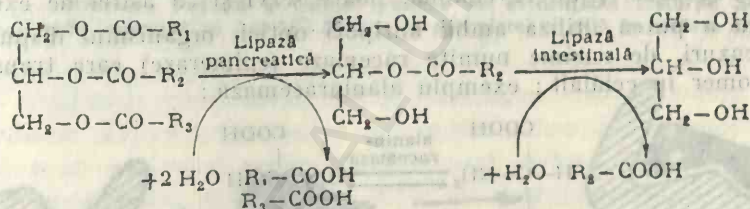


În cazul acesta (și în altele asemănătoare), enzima recunoaște gruparea chimică. Totuși viteza reacțiilor este funcție de alcoolii care servesc ca substrat, cea mai rapidă transformare fiind a alcoolului etilic.

Specificitate relativă cu arie foarte largă din punctul de vedere al numărului substratelor o au enzimele litice de tipul glicozidazelor (hidroliza glicozidelor), proteazelor (hidrolizează legăturile peptidice din peptide și proteine), lipazelor. În cazul acestor enzime apar însă limitări de altă natură. Astfel pepsina, tripsina și chimotripsina, care sînt toate enzime proteolitice digestive, acționează totuși diferențiat asupra legăturilor peptidice, în funcție de resturile aminoacizilor care formează aceste legături. Chimotripsina catalizează hidroliza numai a legăturilor peptidice la a căror formare au participat, cu gruparea carboxil, aminoacizii fenilalanină, tirozină și triptofan; în schimb tripsina are specificitate de acțiune pe legăturile peptidice (formate tot prin gruparea carboxil) ale lizinei și argininei:

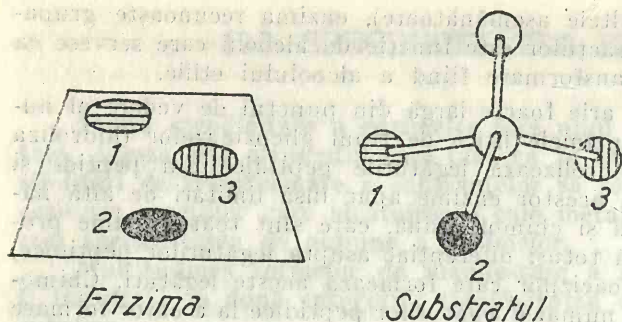


În cazul lipazelor digestive specificitatea este corelată cu poziția legăturii esterice între glicerină și acizii grași; astfel lipaza de origine pancreatică hidrolizează numai legăturile esterice  $\alpha$  și  $\alpha'$  în timp ce lipaza din pereții intestinului hidrolizează numai  $\beta$ -monogliceridele:

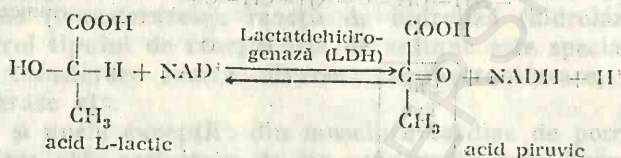


Caracteristicile specificității de substrat a enzimelor menționate mai sus, sînt consecințe ale interacției între enzimă și substrat la nivelul centrului activ al enzimei. Fără a intra în detalii, care vor fi prezentate în continuare, se menționează că poziția substratului fixat pe enzimă nu este oricare ci foarte bine precizată ca urmare a mai multor interacțiuni (puncte de legare). Putem să ne imaginăm pentru moment că fixarea se face prin trei puncte pe care, pentru simplitate, le considerăm coplanare (Fig. II.2). Se remarcă poziționarea strictă a substratului și, în plus, faptul că pentru un substrat ce are doi enantiomeri (un carbon asimetric) numai unul dintre aceștia va putea fi legat și deci supus transformării chimice catalizată de enzimă. Cum majoritatea compușilor organici supuși transformărilor în organisme vii au atomi de carbon asimetrici, fenomenul este general, fiind denumit specificitate stereochemică.

Fig. II.2 — O ilustrație simplificată a specificității stereo-  
chimice a enzimelor.

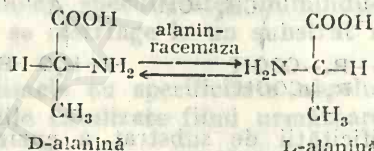


Citeva exemple de specificitate stereochimică: hidroliza de către maltază a glicozidelor de tip  $\alpha$  (nu și a celor  $\beta$ ); în toate reacțiile căii glicolitice enzimele corespunzătoare acționează numai asupra esterilor fosforici ai D-hexozelor și D-triozelor; în sfârșit, în mușchi, lactatdehidrogenaza poate utiliza ca substrat numai acidul L-lactic pe care îl transformă în acid piruvic:

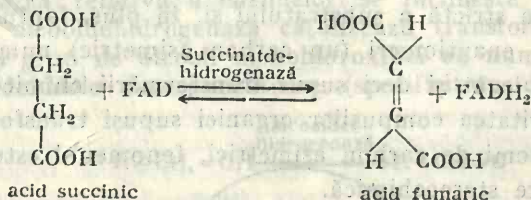


În toate cazurile menționate substratul optic activ este transformat în produs de reacție care poate fi optic activ sau nu. Există și situația inversă când substratul este optic inactiv dar este optic activ produsul de reacție. Se spune că reacția este o „sinteză asimetrică”. Reacția catalizată de lactatdehidrogenază, fiind reversibilă, poate servi și ca astfel de exemplu.

Pentru a putea utiliza ambii antipozi optici, organismul dispune, în anumite cazuri, de enzime numite racemaze (epimeraze) care transformă un enantiomer în celălalt; exemplu alaninracemaza:



Specificitatea stereochimică a enzimelor apare și în reacții în care substratul (sau produsul de reacție) se prezintă sub forma izomerilor cis-trans. Un exemplu este reacția de dehidrogenare a acidului succinic, catalizată de succinatdehidrogenază (una din reacțiile ciclului acizilor tricarboxilici), al cărui produs este acidul fumaric; acidul maleic (izomerul cis) nu se obține nici în urma:





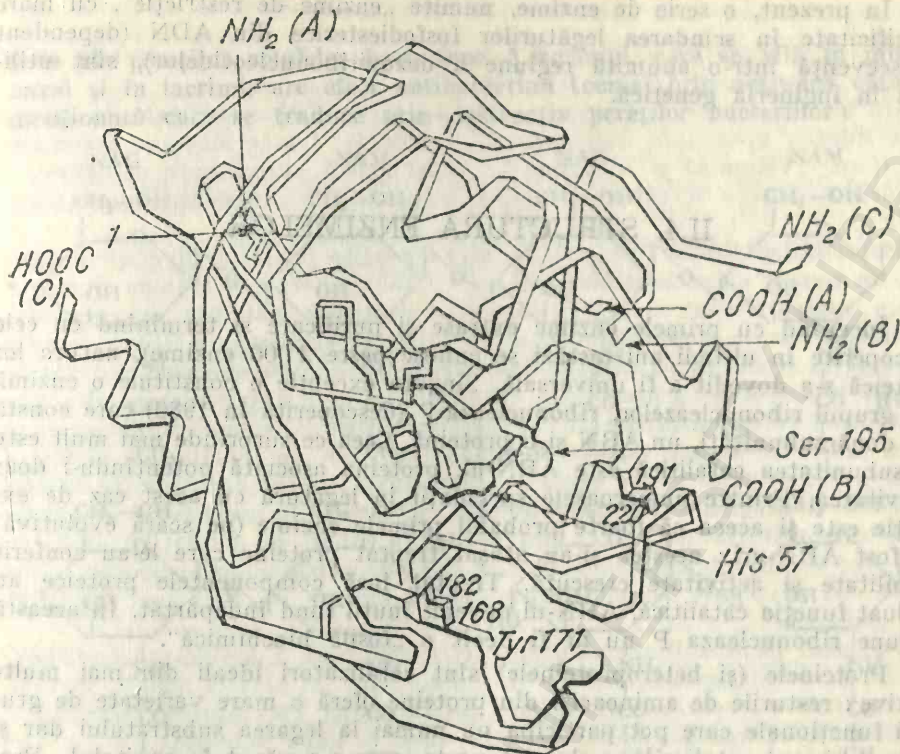


Fig. II.3 — Structura terțiară a chimotripsinei; se evidențiază resturile Ser-195 și His-57 care împreună cu Asp-102 (dispus în apropiere) se află în centrul activ.



Fig. II.4 — Modelul propus de Fischer pentru structura centrului activ (lacăt-cheie).

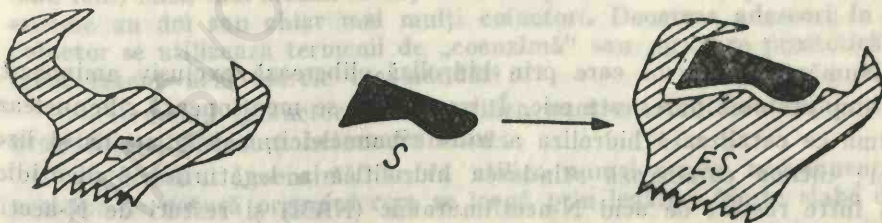


Fig. II.5 — Modelul centrului activ indus propus de Koshland.

În prezent, o serie de enzime, numite „enzime de restricție“, cu mare specificitate în scindarea legăturilor fosfodiesterice din ADN (dependent de secvență într-o anumită regiune a dezoxiribonucleotidelor), sînt utilizate în ingineria genetică.

## II.4. STRUCTURA ENZIMELOR

Începînd cu primele enzime extrase și purificate și terminînd cu cele descoperite în ultimii ani (astăzi se cunosc peste 2 000 enzime), natura lor proteică s-a dovedit a fi universală. Singura excepție o constituie o enzimă din grupul ribonucleazelor, ribonucleaza-P (descoperită în 1986) care constă din două subunități, un ARN și o proteină. Ceea ce surprinde mai mult este că subunitatea catalitică, este ARN-ul, proteina asociată potențîndu-i doar activitatea. Printre numeroasele speculații în legătură cu acest caz de excepție este și aceea că foarte probabil primele enzime (pe scară evolutivă) au fost ARN-uri; acestea și-au atașat treptat proteine care le-au conferit stabilitate și activitate crescută. Treptat însă componentele proteice au preluat funcția catalitică, ARN-ul devenit inutil fiind îndepărtat. În această viziune ribonucleaza P nu ar fi decît o „fosilă biochimică“.

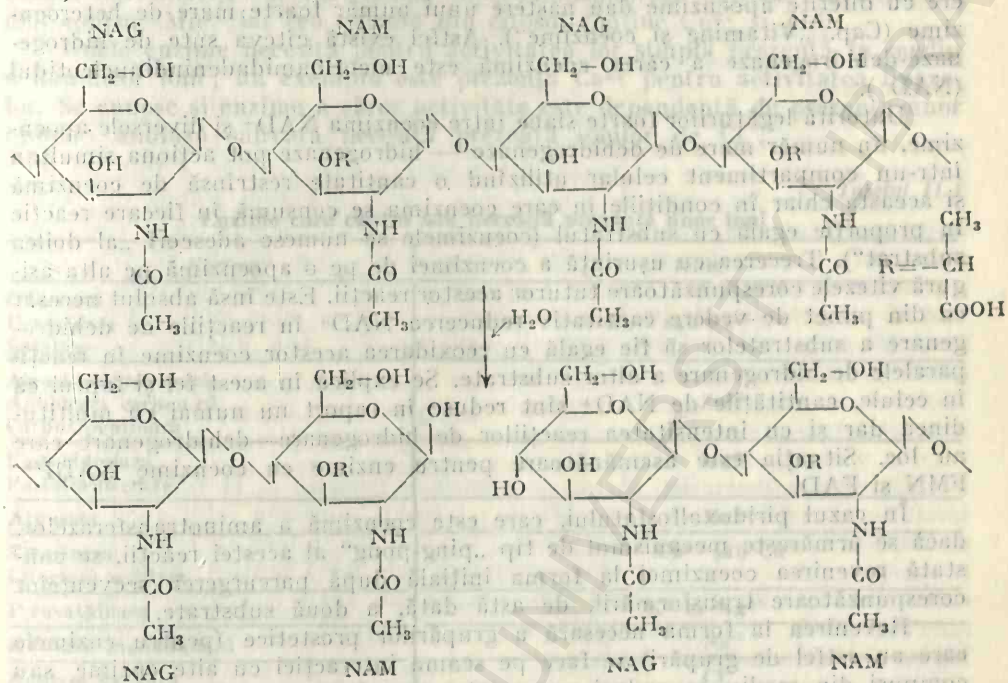
Proteinele (și heteroproteinele) sînt catalizatori ideali din mai multe motive: resturile de aminoacizi din proteine oferă o mare varietate de grupe funcționale care pot participa nu numai la legarea substratului dar și la mecanismul catalizei; pe de altă parte, cum s-a văzut în capitolul „Proteine“, fiecare proteină și deci fiecare enzimă are o structură tridimensională proprie, putînd astfel să fie oferite fiecărei reacții condiții optime de desfășurare. Se menționează în legătură cu aceasta că toate enzimele sînt proteine globulare, deci au structuri primare, secundare și terțiare. Se menționează totodată că multe enzime au, în forma lor nativă, structură cuaternară; aceasta le conferă însușiri suplimentare între care de o deosebită importanță sînt posibilitățile de reglaj a activității prin intermediul unor metaboliți (vezi „izoenzime“ și „enzime alosterice“).

### II.4.1. ENZIME DE NATURĂ EXCLUSIV PROTEICĂ

Numărul enzimelor care prin hidroliză eliberează exclusiv aminoacizi, deci sînt proteine pure, este mic. Între acestea se menționează ribonucleaza (enzimă ce catalizează hidroliza acizilor ribonucleici), chimotripsina și lizozimul; ultima catalizează scindarea hidrolitică a legăturilor  $\beta$ -glicozidice 1 $\rightarrow$ 4 între resturi de acid N-acetilmuramic (NAM) și resturi de N-acetilglucozamină (NAG). Asemenea compuși heterozidici sînt componente esen-



țiale ale pereților celulelor bacteriene. Lizozimul, care se află în mucusul nazal și în lacrimi, are efect antibacterian tocmai prin acțiunea catalitică menționată care se traduce prin distrucția pereților bacteriilor:



Acțiunea catalitică a lizozimului va servi în continuare ca model de legare a substratului și mecanism de cataliză.

## II.4.2. ENZIME DE NATURĂ HETEROPROTEICA

Cele mai multe enzime sînt heteroproteine. Componenta lor proteică se numește apoenzimă iar cea neproteică cofactor. Cofactorii sînt molecule (sau ioni) mici, mai stabile la acțiunea temperaturii decît apoenzimele. Unele enzime au doi sau chiar mai mulți cofactori. Deoarece adeseori în loc de cofactor se utilizează termenii de „coenzimă” sau „grupare prostetică”, s-au făcut recent următoarele recomandări:

— termenul „cofactor” se va utiliza pentru totalitatea compuşilor neproteici din structura heteroenzimelor;

— termenul „coenzimă” se va utiliza numai pentru componentele neproteice de natură organică care se leagă prin legături foarte slabe de apoenzime;

— termenul „grupare prostetică” se va utiliza tot pentru cofactori de natură organică dar care se leagă de apoenzime prin legături puternice.

Pe lângă coenzime și grupări prostetice, în calitate de cofactori apar frecvent cationii unor metale și, foarte rar, unii anioni.

Un număr relativ restrâns de cofactori, în special coenzimele, în asociere cu diferite apoenzime dau naștere unui număr foarte mare de heteroenzime (Cap. „Vitamine și coenzime“). Astfel există câteva sute de hidrogenaze-dehidrogenaze a căror coenzimă este nicotinamidadenindinucleotidul (NAD<sup>+</sup>).

Datorită legăturilor foarte slabe între coenzima NAD<sup>+</sup> și diversele apoenzime, un număr mare de dehidrogenaze — hidrogenaze pot acționa simultan într-un compartiment celular utilizând o cantitate restrânsă de coenzimă și aceasta chiar în condițiile în care coenzima se consumă în fiecare reacție în proporție egală cu substratul (coenzimele se numesc adeseori „al doilea substrat“). Trecerea cu ușurință a coenzimei de pe o apoenzimă pe alta asigură vitezele corespunzătoare tuturor acestor reacții. Este însă absolut necesar ca din punct de vedere cantitativ reducerea NAD<sup>+</sup> în reacțiile de dehidrogenare a substratelor să fie egală cu reoxidarea acestor coenzime în reacții paralele de hidrogenare a altor substraturi. Se explică în acest fel și faptul că în celule, cantitățile de NAD<sup>+</sup> sînt reduse în raport nu numai cu multitudinea dar și cu intensitatea reacțiilor de hidrogenare—dehidrogenare care au loc. Situația este asemănătoare pentru enzime cu coenzime NADP<sup>+</sup>, FMN și FAD.

În cazul piridoxalfosfatului, care este coenzimă a aminotransferazelor, dacă se urmărește mecanismul de tip „ping-pong“ al acestei reacții, se constată revenirea coenzimei la forma inițială după parcurgerea secvențelor corespunzătoare transformării, de astă dată, a două substraturi.

Revenirea la forma necesară a grupărilor prostetice (pentru enzimele care au astfel de grupări) se face pe seama interacției cu alte enzime sau compuși din mediu în cadrul secvențelor metabolice specifice (vezi de ex. participarea citocromilor, al căror grup prostetic este hemul, la lanțul respirator, cap. „Energetică biochimică“).

Cum s-a mai arătat, la multe enzime cofactorii sînt ioni metalici (metaloenzimele). Legăturile între componenta proteică și ionii metalici sînt de tip electrostatic. Stabilitatea complexelor este funcție de numărul și intensitatea acestor interacțiuni. Din studiirea acestor complexe s-a ajuns la concluzia că în general resturile aminoacizilor care eliberează protoni (de ex. Glu, Asp, Ser), sau care au atomi de azot cu electroni neparticipanți (inclusiv atomii de azot din legăturile peptidice) constituie liganzii pentru ionii metalici. Ionii metalici pot fi disociați din complexe; de regulă aceste procese sînt reversibile în sensul că ionul metalic poate fi reintegrat în componenta proteică.

În reacțiile catalizate de metaloenzime, ionii metalici îndeplinesc, de la caz la caz, roluri variate:

- stabilizează structura enzimei;
- participă la legarea substratului;
- induc unele modificări în conformația enzimei, cu efect asupra vitezei reacției;
- participă nemijlocit la cataliză, de exemplu în cazul multor reacții de oxido-reducere.

În legătură cu modul particular de organizare și de acțiune a enzimelor este interesantă și observația că dintre enzimele omoloage (care catalizează



aceeași reacție în țesuturi sau celule diferite) unele sînt metaloenzyme, altele nu conțin ioni metalici; asemenea situații s-au semnalat la enzime cum sînt aldolaza, piruvatecarboxilaza și altele. Pe de altă parte, tot enzime omoloage, uneori chiar din compartimente diferite ale aceluiași tip de celule, conțin ioni diferiți: de ex. enzima superoxidismutază extrasă din mitocondrii conține  $Mn^{2+}$  iar cea extrasă din citosol conține  $Cu^{2+}$  și  $Zn^{2+}$ .

Unele enzime necesită pentru activitatea lor simpla prezență în mediu a anumitor ioni; un exemplu este prezența  $Ca^{2+}$  pentru activitatea lipazelor. Se cunosc și enzime a căror activitate este dependentă de prezența unor anioni: amilaza salivară necesită prezența ionilor de  $Cl^-$ .

Tabelul 11.1

Enzime care conțin sau necesită prezența unor ioni

Enzima	Ionul
Citocromi Peroxidaze Catalaze	$Fe^{2+}$ sau $Fe^{3+}$
Alcooldehidrogenază Anhidraza carbonică Carboxipeptidaza	$Zn^{2+}$
Fosfolidrolaza Fosfotransferaze	$Mg^{2+}$
Arginaza	$Mn^{2+}$
Tirozinaza Citocrom oxidaza	$Cu^{2+}$ sau $Cu^+$
Piruvatkinaza	$K^+$ și $Mg^{2+}$
ATP-ază membranară	$Na^+$
Amilaza salivară	$Cl^-$

În tabelul 11.1 sînt cuprinse o serie de metaloenzyme (cu ioni pe care îi conțin sau ioni a căror prezență este necesară pentru activitate).

### 11.4.3. SISTEME (COMPLEXE) MULTIENZIMATICE

Cercetările din ultimele decenii au evidențiat aspecte tot mai complexe ale structurii enzimelor în relație directă cu funcția lor. Se menționează în acest sens existența așa numitelor „sisteme (complexe) multienzimatică” constind din câteva enzime diferite care catalizează reacții succesive dintr-o anumită cale metabolică și care, printr-o asociere specifică, realizează un complex; eficacitatea sporită a enzimelor în complex este asigurată prin transferul rapid al produsului de reacție a primei enzime către enzima următoare (pentru care devine substrat), ș.a.m.d. Exemple sînt complexul multienzimatic al piruvat dehidrogenazei, complexul multienzimatic al acid-gras-sintetazei etc., acestea urmind a fi prezentate la tratarea căilor metabolice în care intervin.

#### II.4.4. IZOENZIME

S-a stabilit că unele enzime există în forme moleculare multiple; aceste forme se întâlnesc nu numai în țesuturi și organe diferite ci chiar în același organ, de multe ori chiar în același tip de celule. Ele se numesc izoenzime. Izoenzimele unei enzime se pot separa prin mai multe metode, inclusiv prin electroforeză.

Existența izoenzimelor este consecința asocierii mai multor lanțuri polipeptidice (structură cuaternară). Lactat dehidrogenază (LDH), una din primele enzime la care s-a descoperit existența izoenzimelor, a fost cel mai intens studiată. Ea există în cinci forme, toate catalizând reacția de oxidoreducere lactat  $\rightleftharpoons$  piruvat, dar având eficiență catalitică diferită și deosebindu-se prin mai multe proprietăți fizico-chimice. S-a stabilit că cele cinci izoenzime sînt tetrameri rezultați prin asocierea în moduri diferite a două lanțuri polipeptidice de bază, notate M și H, care au mase moleculare și conformații apropiate dar secvențe ale aminoacizilor ușor diferite. Cele cinci izoenzime se notează în două moduri:

$H_4$	$H_3M$	$H_2M_2$	$HM_3$	$M_4$
(LDH <sub>1</sub> )	(LDH <sub>2</sub> )	(LDH <sub>3</sub> )	(LDH <sub>4</sub> )	(LDH <sub>5</sub> )

Biosinteza lanțurilor M (de la muscle = mușchi) și H (de la heart = inimă) este codificată de gene diferite; întrucît asocierea celor două lanțuri de bază în oricare din cele cinci forme tetramerice se face cu egală ușurință, proporțiile relative în care sînt sintetizate cele două lanțuri într-un tip de celule vor determina proporții mai ridicate din unele izoenzime și mai scăzute din altele (predominant  $M_4$  în ficat,  $M_4$  și  $HM_3$  în mușchii scheletici,  $H_4$  și  $H_3M$  în mușchiul cardiac etc.).

Creatinkinaza (notată CK sau CPK) are trei izoenzime, care sînt dimeri ( $M_2$ ; MB;  $B_2$ ) rezultați prin asocierea tot a două lanțuri de bază, M și B.

Pe lângă semnificația deosebită a izoenzimelor în reglarea căilor metabolice, în cunoașterea bazelor moleculare ale morfogenezei și diferențierii celulare, determinarea raportului în care ele se află în ser (zimograma serică) este extrem de utilă în precizarea unor afecțiuni ale ficatului și inimii (vezi „Enzimele în patologie“).

#### II.5. CENTRUL ACTIV ȘI MECANISMUL DE ACȚIUNE AL ENZIMELOR

Prin analogie cu desfășurarea reacțiilor în prezența catalizatorilor chimici și pe baza studiilor de cinetică enzimatică efectuate încă înainte de a se fi obținut enzime în stare pură, s-a formulat conceptul că în reacțiile catalizate de enzime, formarea complexului enzimă-substrat precedă transformarea chimică a substratului. Reacțiile enzimatice cele mai simple pot fi reprezentate prin schema generală (vezi „cinetica reacțiilor enzimatice“):





În prezent dispunem de numeroase dovezi experimentale, unele directe, altele indirecte, privitoare la formarea complexului ES. Un număr redus de enzime fixează substratul prin legături puternice (covalente) și în aceste cazuri complexe ES au fost analizate prin difracția razelor X și alte metode. Complexele în care legăturile între E și S sînt slabe s-au studiat pe căi indirecte: saturînd enzima cu substratul s-au obținut modificări în spectrul de absorbție, solubilitate, stabilitate termică etc. Foarte importante au fost și observațiile că, în anumite cazuri, îndepărtarea prin proteoliză a unor porțiuni din macromoleculele enzimelor nu afectează (sau afectează în mică măsură) activitatea acestora.

Aceste date experimentale, corelate și cu faptul că de regulă substratul este foarte mic în raport cu enzima, au permis formularea concluziei că numai o zonă restrînsă din enzimă participă la fixarea și transformarea chimică a lui S; această zonă se numește „centrul activ” al enzimei.

În centrele active ale enzimelor s-au evidențiat grupări chimice de tip carboxil, amino, hidroxil și tio, care aparțin unor resturi de aminoacizi cu caracter acid sau bazic (glutamic, aspartic, lizină, serină, tirozină, cisteină, etc.) dar și heterociclii, în special al histidinei. Aceste grupări sau resturi heterociclice nu aparțin (sau aparțin rareori) unor aminoacizi vecini în secvența (structura primară) proteinei-enzimă. Astfel în centrul activ al chimotripsinei s-au identificat gruparea OH a serinei din poziția 195, gruparea carboxil a acidului aspartic din poziția 102 și nucleul imidazolic al histidinei din poziția 57. Ele sînt totuși foarte apropiate în spațiu ca urmare a conformației specifice a chimotripsinei (fig. 11.3).

Pe plan mai general, în legătură cu centrul activ, unii autori consideră că acesta este alcătuit dintr-un „centru de legare” și un „centru catalitic”. Este însă mai corect să se spună că în centrul activ unele grupări (sau radicali ai aminoacizilor) sînt implicate în legarea substratului, altele asigură cataliza propriu-zisă, ele fiind „intercalate” (vezi mecanismul acțiunii lizozimului“).

Tot pe plan mai general, în legătură cu organizarea spațială a centrului activ a enzimelor (raportată la structura substratului) s-au elaborat două modele:

— Modelul „clasic” al structurii spațiale a centrului activ în raport cu structura substratului este acela de „lacăt-cheie” propus de Emil Fischer, util pentru înțelegerea modului de fixare a substratului (fig. 11.4).

— Modelul rigid propus de Emil Fischer a fost înlocuit în ultima vreme cu un model dinamic propus de Koshland și numit „centrul indus” („induced fit“).

Modelul Koshland presupune o flexibilitate a zonei în care se află centrul activ. În enzima liberă, centrul activ este „preformat” ceea ce înseamnă că el are o configurație spațială ușor diferită de cea necesară fixării substratului. Substratul induce o „modificare conformațională” a zonei centrului activ realizîndu-se configurația optimă fixării. În fig. 11.5 se redă una din reprezentările simplificate ale modelului Koshland (în alte reprezentări se ține seama și de coenzimă). În cazul heteroenzimelor, cofactorii sînt situați în vecinătatea centrului activ.

\* Prin „modificare conformațională” se înțelege o schimbare discretă în conformație, fără afectarea legăturilor covalente.

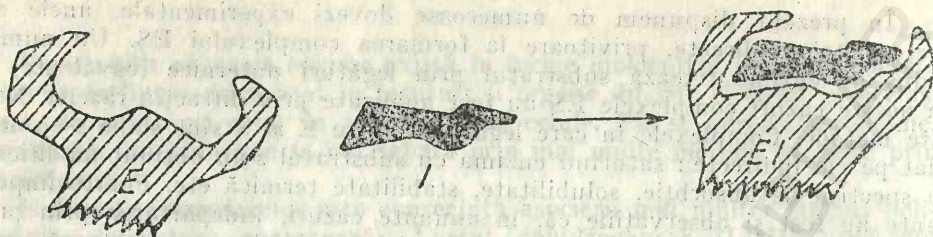


Fig. 11.6 — Legarea inhibitorului competitiv la centrul activ indus al enzimei.

Din punct de vedere termodinamic, așezarea cea mai potrivită a substratului în raport cu enzima reduce la minimum gradele de libertate în ce privește translația și rotația substratului, adică îi micșorează entropia, ceea ce favorizează atingerea ușoară a stării de tranziție; aceasta explică în parte scăderea energiei de activare a reacției catalizate enzimatic.

Specificitatea stereochemică și mai ales inhibiția competitivă a enzimelor pot fi explicate cu ușurință pe baza modelului Koshland: plasarea în centrul activ a unor compuși analogi structural cu substratul se redă intuitiv în figura 11.6 (despre inhibiția competitivă vezi la „cinetică enzimatică“).

Desigur că fiecare enzimă prezintă o structură strict specifică a centrului activ (cu stările „preformată“ și „indusă“). Aceasta nu exclude existența unor analogii în ceea ce privește structurile centrelor active pentru enzime cu funcție apropiată. Cel puțin în privința grupărilor care leagă substratul s-au evidențiat analogii. Astfel, o serie de enzime proteolitice au în centrul activ un rest de serină; mai mult, în vecinătatea restului de serină variația resturilor de aminoacizi este foarte redusă:

Tripsină :	-Gln-Asp-Gly-Ser-Gly-Gly-Pro-
Chimotripsină :	-Met-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-
Trombină :	-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-

Aceasta demonstrează că, cel puțin în linii mari, scindările proteolitice sînt asemănătoare ca mecanism, situație de așteptat să se întîlnească și pentru alte tipuri de reacții catalizate.

Cunoașterea grupărilor funcționale și a altor detalii structurale a centrelor active ale unor enzime a oferit și posibilitatea formulării, evident probabilistice, a mecanismelor de reacție. În cazul chimotripsinei se presupune că în lipsa substratului imidazolul His-57 interacționează prin legături de hidrogen cu un oxigen a grupării COOH a Asp-102 și cu hidrogenul grupării OH a Ser-195. Cînd substratul este fixat în „cavitatea“ în care se află centrul activ (și a cărei poziționare este realizată prin diverse interacții) hidrogenul de la gruparea OH a serinei este transferat ca proton pe azotul restului imidazolic; el formează acum o legătură de hidrogen cu azotul grupării peptidice a substratului în timp ce O<sup>-</sup> a restului de serină atacă nucleofil atomul de carbon a grupării peptidice a substratului. Prin aceasta se induce scindarea heterolitică a legăturii peptidice. Într-o fază intermediară, gruparea carbonil a legăturii peptidice (cu restul proteic de care este atașată) se leagă covalent de serină în timp ce gruparea NH (de asemenea cu



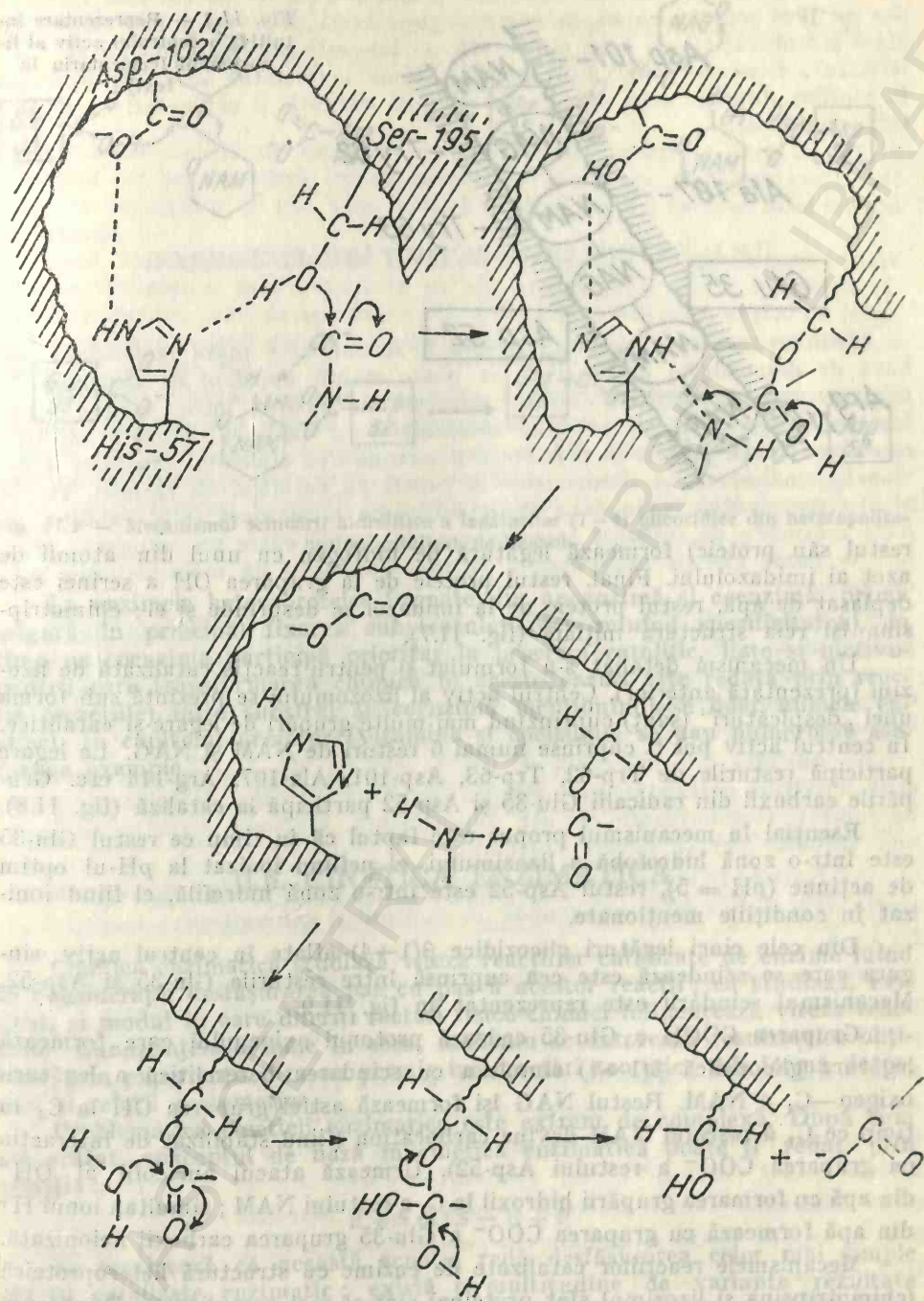
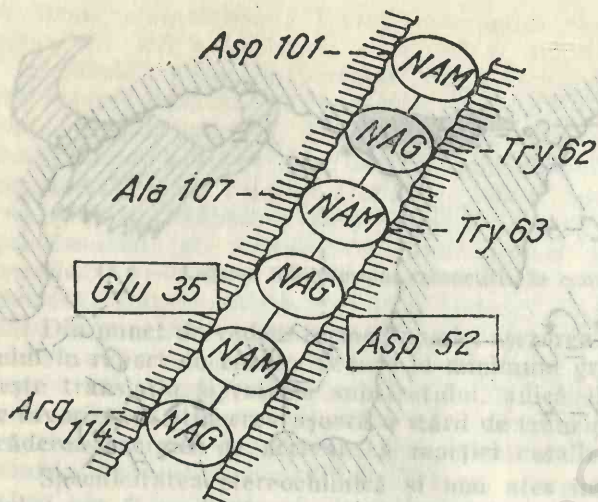


Fig. 11.7 — Mecanismul propus pentru scindarea hidrolitică catalizată de chimotripsină a legăturilor peptidice (detalii în text).

Fig. II.8 — Reprezentare intuitivă a centrului activ al lizozimului (comentariu în text).



restul său proteic) formează legătură de hidrogen cu unul din atomii de azot ai imidazolului. Final, restul proteic de la gruparea OH a serinei este deplasat de apă, restul proteic de la imidazol se desprinde și el; chimotripsina își reia structura inițială (fig. II.7).

Un mecanism detaliat s-a formulat și pentru reacția catalizată de lizozim (prezentată anterior). Centrul activ al lizozimului se prezintă sub forma unei „despicături” (șanț) cuprinzând mai multe grupări de legare și catalitice. În centrul activ pot fi cuprinse numai 6 resturi de NAM și NAG. La legare participă resturile de Trp-62, Trp-63, Asp-101, Ala-107, Arg-114 etc. Grupările carboxil din radicalii Glu-35 și Asp-52 participă la cataliză (fig. II.8).

Esențial în mecanismul propus este faptul că în timp ce restul Glu-35 este într-o zonă hidrofobă a lizozimului, el nefiind ionizat la pH-ul optim de acțiune ( $pH = 5$ ), restul Asp-52 este într-o zonă hidrofilă, el fiind ionizat în condițiile menționate.

Din cele cinci legături glicozidice  $\beta(1 \rightarrow 4)$  aflate în centrul activ singura care se scindează este cea cuprinsă între resturile Glu-35 și Asp-52. Mecanismul scindării este reprezentat în fig. II.9.

Gruparea  $COOH$  a Glu-35 cedează protonul oxigenului care formează legătura glicozidică  $\beta(1 \rightarrow 4)$  simultan cu scindarea heterolitică a legăturii oxigen- $C_1$  a NAM. Restul NAG își formează astfel gruparea OH la  $C_4$  în timp ce  $C_1$  a restului NAM devine carbocation (fiind stabilizat de interacția cu gruparea  $COO^-$  a restului Asp-52). Urmează atacul nucleofil al  $OH^-$  din apă cu formarea grupării hidroxil la  $C_1$  a restului NAM; simultan ionul  $H^+$  din apă formează cu gruparea  $COO^-$  a Glu-35 gruparea carboxil neionizată.

Mecanismele reacțiilor catalizate de enzime cu structură heteroproteică (chimotripsina și lizozimul sînt proteine) sînt și mai complicate. După cum s-a mai arătat (vezi structura enzimelor), cofactorii participă atît la legarea substratului cît și la formarea produsului de reacție.



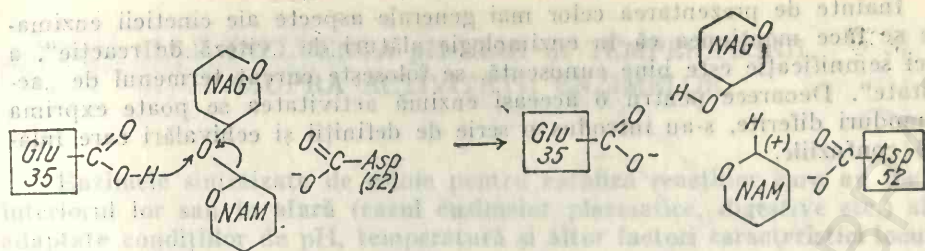


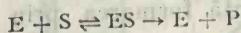
Fig. II.9 — Mecanismul scindării hidrolitice a legăturilor (1—4) glicozidice din heteropolizaharide, catalizat de lizozim.

La enzimele heteroproteice formate din apoenzimă și coenzimă, prima asigură în principal fixarea substratului (determinând specificitatea), în timp ce coenzima participă prioritar la procesul catalitic. Este și motivul pentru care transformarea chimică în aceste cazuri este redată prin reacția (reacțiile) între substrat și coenzimă menționându-se doar numele enzimei. În capitolul următor (Vitamine și coenzime) se dau numeroase asemenea exemple.

## II.6. CINETICA ENZIMATICĂ

Cinetica enzimatică studiază viteza reacțiilor catalizate de enzime luând în considerație desfășurarea pas cu pas a acestor reacții; ea studiază, evident, și modul în care diferiți factori fizico-chimici influențează viteza reacțiilor. Cunoștințele actuale în acest domeniu se datorează rezultatelor obținute prin experiențe care au permis interpretări teoretice sub formă de reguli și relații matematice.

Problematica cineticii enzimatice este extrem de complexă. După cum s-a arătat, conceptul de bază în cinetica enzimatică poate fi redat prin ecuația:



Se precizează că această ecuație redă desfășurarea celor mai simple reacții catalizate enzimatic; există o multitudine de variante rezultate de ex. din faptul că unele enzime au două (sau chiar mai multe) substraturi, că etapa  $ES \rightarrow E + P$  parcurge mai multe subetape, ș.a.m.d.

Înainte de prezentarea celor mai generale aspecte ale cineticii enzimatică se face mențiunea că în enzimologie alături de „viteză de reacție”, a cărei semnificație este bine cunoscută, se folosește curent termenul de „activitate”. Deoarece pentru o aceeași enzimă activitatea se poate exprima în moduri diferite, s-au introdus o serie de definiții și echivalări care înlătură confuziile.

## II.6.1. EXPRIMAREA ACTIVITĂȚII ENZIMELOR

Pentru enzimele purificate cărora li se cunoaște masa moleculară, pe bază de determinări de cinetică, se poate stabili numărul de molecule de substrat transformate de către o moleculă de enzimă într-o secundă, valoare ce reprezintă „activitatea moleculară” a enzimei. Această mărime este importantă pentru că permite atât compararea eficienței catalitice a diverselor enzime cit și a enzimelor în raport cu catalizatorii chimici. Pe de altă parte, pentru enzimele a căror activitate moleculară este stabilită, pe baza măsurării de substrat transformat, de ex. de către un omogenat tisular, se poate calcula concentrația enzimei (numărul de molecule) din acel omogenat.

În practica biochimică curentă, inclusiv în cazul determinărilor enzimatică în scop de diagnostic (în special în ser), interesează mai puțin activitatea absolută, fiind însă importante variațiile de activitate; în acest caz este suficient să existe o anumită unitate arbitrară de activitate care să servească drept referință. Se utilizează următoarele unități:

— unitatea internațională (U.I.); o unitate internațională reprezintă acea activitate enzimatică care asigură conversia a 1  $\mu$ mol de substrat/minut în condiții standardizate de pH, temperatură, prezența cofactorilor (care sînt stabilite pentru fiecare enzimă);

— Katalul (Kat); 1 Kat reprezintă acea activitate care asigură transformarea unui mol de substrat/secundă (cu multipli și submultipli); 1  $\mu$ Kat/1 = 60 UI/1.

Pentru unele enzime se utilizează și alte unități. Astfel pentru oxidoreductazele cu coenzime  $\text{NAD}^+$  ( $\text{NADH} + \text{H}^+$ ) sau  $\text{NADP}^+$  ( $\text{NADPH} + \text{H}^+$ ), activitatea se exprimă prin creșterea sau scăderea extincției la 340 nm, formele reduse ale coenzimelor absorbînd această radiație, în timp ce formele oxidate nu o absorb; o unitate enzimatică pentru aceste hidrogenaze—dehidrogenaze reprezintă creșterea sau scăderea cu 0,001 a extincției la 340 nm într-un minut (cuva de 1 cm). Pentru fosfatazele din ser se utilizează unitatea Bodansky care reprezintă formarea, prin hidroliza esterilor fosforici, a unui mg de fosfat anorganic (în condiții standardizate de pH, temperatură, etc.).

Recent s-a convenit ca temperatura de 30°C să fie luată ca standard cînd se măsoară activitatea enzimelor.



## II.6.2. INFLUENȚA pH-ULUI ȘI TEMPERATURII ASUPRA ACTIVITĂȚII ENZIMELOR

Enzimele sintetizate de celule pentru cataliza reacțiilor care au loc în interiorul lor sau în afară (cazul enzimelor plasmatiche, digestive etc.) sînt adaptate condițiilor de pH, temperatură și altor factori caracteristici locului de acțiune.

Dacă în organismul uman temperatura la care se desfășoară toate reacțiile enzimatice este constantă (37°C), atunci cînd se fac studii de cinetică cu enzime pure, temperatura poate fi variată în limite destul de largi. Viteza oricărei reacții catalizate enzimatic variază cu temperatura după o curbă ca cea din fig. II.10.

Creșterea vitezei reacției catalizate odată cu creșterea temperaturii este interpretată prin prisma „energiei de activare”, așa cum s-a prezentat anterior. Pentru fiecare enzimă se poate stabili (în condițiile menținerii constante a celorlalți parametri) un „coeficient termic al reacției” ( $Q_{10}$ ) dat de raportul vitezelor de reacție la o temperatură  $K_t + 10^\circ\text{C}$  față de cea la  $K_t$ ;

$$Q_{10} = \frac{K_t + 10^\circ}{K_t}$$

Valoarea coeficientului termic pentru reacțiile enzimatice este cuprinsă obișnuit între 1 și 2 fiind mai mică decît pentru reacțiile chimice necatalizate ( $Q_{10}$  între 2—4). Relația este valabilă numai pînă la o anumită temperatură numită temperatură optimă,  $T_{opt}$  pentru care viteza atinge, evident, valoarea maximă. Peste  $T_{opt}$  viteza reacției scade brusc datorită denaturării termice a apoenzimei (constînd mai ales în ruperea legăturilor de hidrogen), fiind afectat centrul activ.  $T_{opt}$  pentru enzimele din organismul uman este între 40—50°C. Există enzime, în alte sisteme vii, a căror  $T_{opt}$  este mai ridicată (50—60°C la enzime din plante, chiar 80—100°C la enzime din microorganisme care trăiesc în ape termale).

Viteza reacțiilor enzimatice este influențată de asemenea de pH (fig. II.11). Pentru enzimele din organismul uman pH-ul optim de acțiune este chiar pH-ul normal al mediului în care ele își îndeplinesc funcția catalitică (cazul pepsinei și amilazei salivare din figură). Cum în majoritatea țesuturilor din organism pH-ul este în jurul lui 7 și enzimele au acțiunea optimă în apropierea acestei valori.

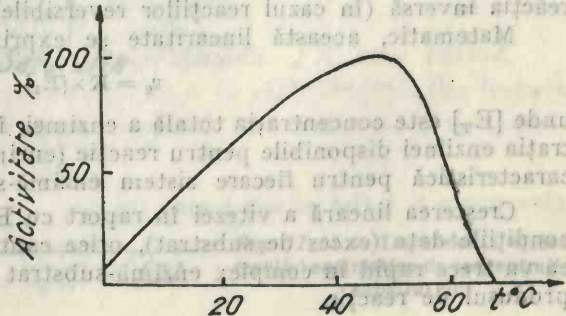
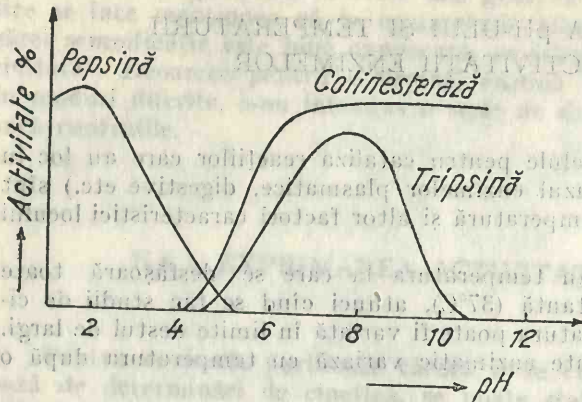


Fig. II.10. — Variația activității enzimelor în funcție de temperatură.

Fig. 11.11 — Variația activității unor enzime în funcție de pH.



Diminuarea vitezei reacției enzimatice la valori de pH mai mici sau mai mari decât cel optim se realizează în mod specific pentru fiecare enzimă. Între multiplele acțiuni ale ionilor  $H^+$  și  $OH^-$  asupra enzimelor se menționează în primul rând efectul lor denaturant; spre deosebire de efectul denaturant al temperaturii, în acest caz se rup mai ales legăturile care asigură structura terțiară (decă se realizează o denaturare ireversibilă). La enzimele în al căror centru activ se află grăpări ionizabile, acide sau bazice, acestea interacționează direct cu ionii  $H^+$  și  $OH^-$ , rezultatul fiind creșterea sau scăderea gradului lor de disociere; ionii de  $H^+$  și  $OH^-$  acționează în acest caz ca adevărați inhibitori (vezi mai departe inhibiția activității enzimelor).

Un exemplu de acțiune a pH-ului asupra enzimei îl constituie inactivarea la nivelul stomacului (pH 1—2) a amilazei salivare (pH optim 6,6—6,8) care este antrenată cu alimentele din cavitatea bucală.

### II.6.3. INFLUENȚA CONCENTRAȚIEI ENZIMEI

În condiții optime de temperatură, pH și concentrație a substratului, creșterea concentrației enzimei în mediu are ca rezultat creșterea corespunzătoare a vitezei inițiale, notată  $v_0$  (Fig. 11.12);  $v_0$  este viteza reacției enzimatice imediat după amestecarea substratului cu enzima astfel încât reacția inversă (în cazul reacțiilor reversibile) să nu poată avea loc.

Matematic, această linearitate se exprimă prin relația:

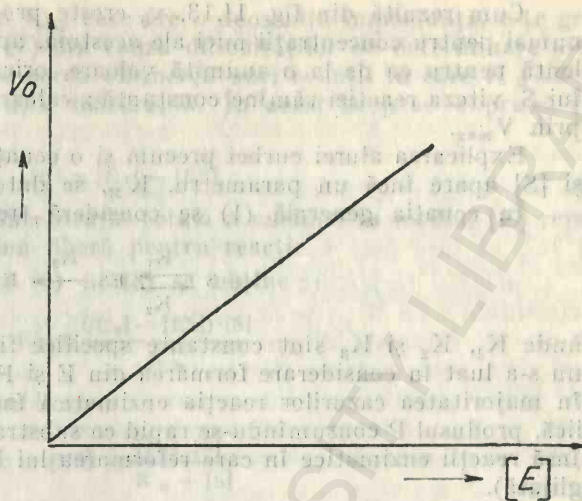
$$v_0 = K \times [E_T]$$

unde  $[E_T]$  este concentrația totală a enzimei, în acest caz identică cu concentrația enzimei disponibile pentru reacție (enzima liberă),  $K$  fiind o constantă caracteristică pentru fiecare sistem enzimă-substrat.

Creșterea lineară a vitezei în raport cu  $E_T$  se explică prin faptul că, în condițiile date (exces de substrat), orice cantitate de enzimă se va adăuga, ea va trece rapid în complex enzimă-substrat și, corespunzător, se va forma produsul de reacție.



Fig. II.12 — Viteza reacțiilor enzimaticre crește proporțional cu  $E$  (dacă  $S$  este un exces).



## II.6.4. INFLUENȚA CONCENTRAȚIEI SUBSTRATULUI. ECUAȚIA MICHAELIS-MENTEN

Cu excepția enzimelor numite „inductibile“ (vezi „Reglarea activității enzimelor“), în țesuturi sau în afara acestora, concentrația enzimelor suferă variații mici în timp astfel încât ea poate fi considerată constantă. În schimb concentrația substratelor poate varia destul de mult după starea metabolică a țesutului.

Dependența vitezei de reacție de concentrația substratului, în condițiile menținerii constante a concentrației enzimice (pH și temperatura de asemenea constante), constituie aspectul cel mai important al cineticii enzimaticre. În acest caz, reprezentarea grafică a lui  $v_0$  în funcție de  $[S]$  conduce la o curbă cu aspect de hiperbolă (fig. II.13). Se face aici mențiunea că există și enzime pentru care în loc de hiperbolă se obține o curbă sigmoidală (vezi „Enzime alosterice“).

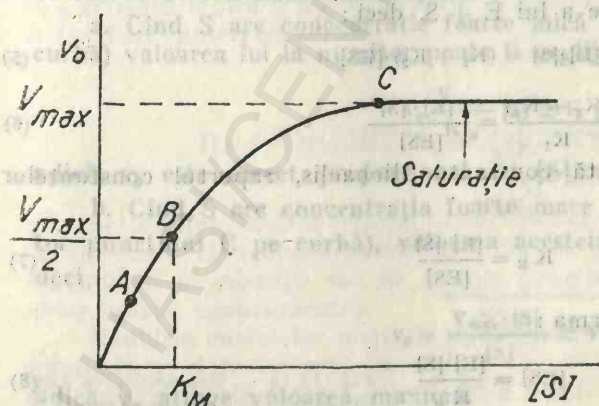
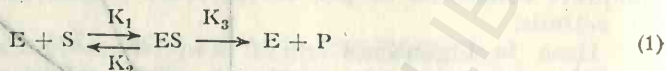


Fig. II.13 — Dependența vitezei reacției enzimaticre de concentrația substratului.

Cum rezultă din fig. II.13,  $v_0$  crește, proporțional cu creșterea lui  $[S]$  numai pentru concentrații mici ale acestuia, apoi creșterea lui  $v_0$  este tot mai lentă pentru ca de la o anumită valoare, oricât de mult crește concentrația lui  $S$ , viteza reacției rămâne constantă; valoarea maximă a lui  $v_0$  se notează prin  $V_{\max}$ .

Explicarea alurei curbei precum și o ecuație în care alături de  $v_0$ ,  $V_{\max}$  și  $[S]$  apare încă un parametru,  $K_M$ , se datoresc lui Michaelis și Menten. În ecuația generală (1) se consideră trei reacții



unde  $K_1$ ,  $K_2$  și  $K_3$  sînt constante specifice fiecăreia dintre ele. În schemă nu s-a luat în considerare formarea din  $E$  și  $P$  a lui  $ES$  datorită faptului că în majoritatea cazurilor reacția enzimatică face parte dintr-o cale metabolică, produsul  $P$  consumîndu-se rapid ca substrat al reacției următoare (există însă reacții enzimatice în care reformarea lui  $ES$  din  $E$  și  $P$  nu poate fi neglijată).

Viteza reacției enzimatice se exprimă, evident, prin cantitatea de  $P$  format într-o unitate de timp,  $[P]$  fiind proporțional cu  $[ES]$ . Se poate deci scrie:

$$v_0 = K_3[ES] \quad (2)$$

Cantitatea de  $ES$  din sistem care se transformă în  $E$  și  $P$  este însă dependentă pe de o parte de viteza cu care el se formează, pe de altă parte cu viteza de desfacere în  $E$  și  $S$ , viteze redată prin:

$$\text{— viteza de formare a lui } ES = K_1[E] \cdot [S] \quad (3)$$

unde prin  $[E]$  se notează concentrația enzimei libere.

$$\text{— viteza de desfacere a lui } ES = K_2[ES] \quad (4)$$

Considerînd din nou că reacția face parte dintr-o cale metabolică, situație care se caracterizează prin faptul că diverșii intermediari sînt în concentrații apropiate („steady state“, stare staționară),  $[ES]$  va rămîne practic constant variînd numai  $[S]$  și  $[P]$ . Condiția matematică pentru aceasta este ca viteza de formare a lui  $ES$  să fie egală cu suma vitezelor de transformare în  $E$  și  $P$  și de refacere a lui  $E + S$ , deci:

$$K_1[E] \cdot [S] = (K_2 + K_3) \cdot [ES] \quad (5)$$

sau

$$\frac{(K_2 + K_3)}{K_1} = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} \quad (6)$$

Notînd prin  $K_M$ , numită constanta Michaelis, raportul constantelor  $K_2 + K_3/K_1$ , se obține:

$$K_M = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} \quad (7)$$

care poate fi scrisă și sub forma:

$$[ES] = \frac{[E] \cdot [S]}{K_M} \quad (8)$$



Valoarea numerică a lui  $K_M$ , care are o deosebită importanță, este greu de obținut pe baza relației (7) din cauza dificultăților de determinare a lui  $[E]$  și  $[ES]$ . Se urmărește de aceea obținerea unei ecuații în care  $K_M$  să fie corelat cu parametrii mai ușor măsurabili. În acest scop se exprimă  $[E]$  prin :

$$[E] = [E_T] - [ES] \quad (9)$$

unde prin  $[E_T]$  s-a notat concentrația totală a enzimei în mediu,  $[E]$  reprezentînd fracțiunea de enzimă liberă pentru reacție.

Substituind pe  $[E]$  din (9) în (8) se obține :

$$ES = \frac{([E_T] - [ES]) \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (10)$$

care, prin rezolvare conduce la :

$$[ES] = \frac{[E_T] \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (11)$$

Substituind această valoare a lui  $ES$  în (2) se obține :

$$v_0 = \frac{K_2 [E_T] \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (12)$$

Cînd concentrația substratului este atît de mare încît toată enzima din sistem este sub forma  $ES$ , deci cînd enzima este saturată,  $v_0$  din ec. (2) se poate înlocui cu  $V_{max}$  :

$$V_{max} = K_2 \cdot [E_T] \quad (13)$$

și substituind în (12) se obține :

$$v_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]} \quad (14)$$

Aceasta este ecuația Michaelis-Menten, sau ecuația de viteză a reacțiilor enzimatice cu un singur substrat. Prin intermediul parametrilor  $K_M$ ,  $[S]$  și  $V_{max}$  (care exprimă indirect concentrația enzimei), ea permite calculul lui  $v_0$  în acord deplin cu alura curbei experimentale din fig. II.13. Pentru verificare se iau două cazuri particulare :

a. Cînd  $S$  are concentrație foarte mică (corespunzător punctului A pe curbă) valoarea lui la numitor poate fi neglijată și ecuația (14) devine :

$$v_0 \frac{V_{max}}{K_M} [S] \approx K \cdot [S] \quad (15)$$

adică  $v_0$  este direct proporțional cu  $[S]$  ;

b. Cînd  $S$  are concentrația foarte mare în raport cu  $K_M$  (corespunzător punctului C pe curbă), valoarea acesteia din urmă poate fi neglijată, deci :

$$v_0 = \frac{V_{max} \cdot [S]}{[S]} \approx V_{max} \quad (16)$$

adică  $v_0$  atinge valoarea maximă.

În cazul particular cînd  $v_0 = \frac{V_{\max}}{2}$  (punctul B pe curbă), substituind în (14) se obține :

$$\frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]} ; 2[S] = K_M + [S] ; K_M = [S] \quad (17)$$

ceea ce permite să se tragă următoarea concluzie : „ $K_M$  este egală cu concentrația substratului pentru care  $v_0$  este jumătate din  $V_{\max}$ “. Exprimarea lui  $K_M$  se face deci în unitățile de concentrație.

Concluzia formulată indică totodată și modalitatea determinării experimentale a lui  $K_M$  ; se măsoară  $v_0$  a reacției la o serie de probe care conțin aceeași cantitate de enzimă dar cantități de substrat din ce în ce mai mari. Din reprezentarea grafică a lui  $v_0$  în funcție de  $[S]$  se scoate  $V_{\max}$ , apoi se ia  $V_{\max}/2$  și prin interpolare se obține  $K_M$ . Pentru a aprecia cu exactitate pe  $V_{\max}$  este necesar să se efectueze un număr mare de determinări, în special în zona de concentrații a lui S pentru care enzima se saturează.

## II.6.5. ECUAȚIA LINEWEAVER-BURK. SEMNIFICAȚIA LUI $K_M$

Matematic, ecuația Michaelis-Menten poate fi transformată în moduri variate. O variantă, datorată lui Lineweaver și Burk, este forma reciprocă :

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (18)$$

Variabilele fiind  $[S]$  și  $v_0$ , ecuația este de forma generală  $y = ax + b$ . Reprezentînd grafic  $1/v_0$  în funcție de  $1/[S]$  se obține o dreaptă (fig. II.14). Intersecția dreptei cu ordonata corespunde valorii  $1/V_{\max}$  iar panta dreptei este dată de  $K_M/V_{\max}$ . Dacă se prelungește dreapta pînă la intersecția cu abscisa, se obține valoarea  $-\frac{1}{K_M}$ .

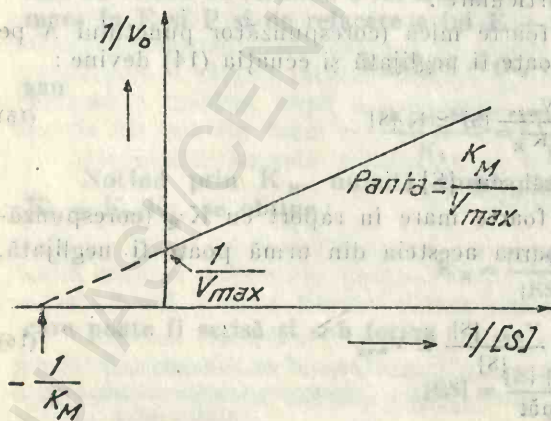


Fig. II.14 — Reprezentarea grafică a ecuației Lineweaver-Burk.



Din punctul de vedere al determinării experimentale a lui  $K_M$  și  $V_{max}$ , reprezentarea lui  $1/v_0$  în funcție de  $1/[S]$  este avantajoasă, numărul de probe necesare pentru obținerea dreptei (și deci a lui  $V_{max}$  și  $K_M$ ) fiind mult mai mic în comparație cu numărul de probe necesare obținerii hiperbolei. Pe de altă parte, ecuația lui Lineweaver și Burk este extrem de utilă în studiul inhibiției activității enzimelor prin compuși chimici (vezi „Inhibiția activității enzimelor”).

$K_M$  este o mărime cu deosebită importanță în enzimologie. În general, valorile ei sînt cuprinse între  $10^{-1}$  —  $10^{-6}$  M. În tabelul II.2 se dau valorile  $K_M$  pentru cîteva enzime în raport cu substratul sau substratele (pentru enzime cu specificitate de grup sau specificitate largă).

Tabel II.2.

Valorile  $K_M$  ale cîtorva enzime

Enzima	Substratul	$K_M$ (moli/l)
Catalază	$H_2O_2$	$25 \times 10^{-3}$
Anhidrază carbonică	$CO_2 + H_2O$	$9 \times 10^{-3}$
Hexokinază	Glucoză	$15 \times 10^{-5}$
Hexokinază	Fructoză	$15 \times 10^{-4}$
Glutamatdehidrogenază	Acid glutamic	$12 \times 10^{-5}$
Aspartat aminotransferază	Acid aspartic	$9 \times 10^{-4}$
Chimotripsină	Acetil-L-triptofan-amidă	$5 \times 10^{-3}$

Semnificația lui  $K_M$  poate fi dedusă din raportul  $K_M = (K_2 + K_3)/K_1$ ; în unele reacții enzimatice  $K_2 \gg K_3$ ; neglijînd pe  $K_3$  se obține:

$$K_M = \frac{K_2}{K_1}$$

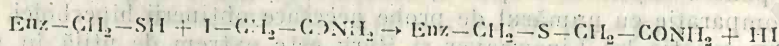
Ținînd seama și de ecuațiile (3) și (4), respectiv formarea complexului ES și disocierea acestuia,  $K_M$  reprezintă constanta de disociere a complexului ES. În alți termeni,  $K_M$  redă tăria legăturii între E și S în complex; o valoare  $K_M$  ridicată indică o legătură slabă în timp ce o valoare  $K_M$  scăzută indică o legătură puternică.

## II.6.6. INHIBIȚIA ACTIVITĂȚII ENZIMELOR

Activitatea multor enzime este inhibată de compuși chimici diverși; în sistemele vii (celule) asemenea compuși pot fi de origine endogenă (de ex. diferiți metaboliți) sau de origine exogenă (cum sînt agenții toxici sau chiar unele medicamente).

Inhibiția enzimelor poate fi reversibilă și ireversibilă, aceasta din urmă numindu-se și inactivare. În ambele cazuri inhibitorul se leagă de enzimă, dar, în timp ce în inhibiția ireversibilă legătura enzimă—inhibitor este tare (covalentă), în inhibiția reversibilă legătura este slabă.

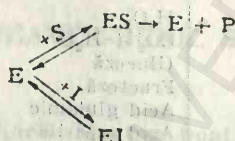
Un exemplu de inhibiție ireversibilă este oferit de acțiunea iodacetamidei asupra enzimelor care au în centrul activ o grupare  $-SH$ ; are loc reacția:



Iodacetamida și inhibitorii care acționează asemănător sînt otrăvuri foarte puternice. În cercetarea biochimică ei sînt utilizați pentru blocarea căilor metabolice la nivelul anumitor reacții; produșii reacțiilor anterioare celei blocate se acumulează în sistem și pot fi mai ușor identificați.

Inhibiția reversibilă este de două tipuri:

a. inhibiția competitivă a cărei caracteristică constă în aceea că inhibitorul se leagă, prin legături slabe, la nivelul centrului activ al enzimei. În cazul prezenței simultane în mediu (sau în celule) a substratului și inhibitorului, între ei are loc o competiție pentru fixare. La o capacitate egală de legare la nivelul centrului activ, enzima va fixa pe acela dintre competitori care se află într-o concentrație mai mare. Reacțiile care au loc în acest caz sînt:



de unde rezultă că formarea lui EI este retrogradă cu atît mai mult cu cît  $[\text{S}]$  este mai mare.

Precizarea că un anumit compus este inhibitor competitiv pentru o reacție enzimatică dată se face în mod simplu; se reprezintă grafic, în sistemul de coordonate  $1/v_0$  funcție de  $1/[\text{S}]$ , datele obținute în situația în care în mediul de reacție se află enzima, substratul și inhibitorul (fig. II.15).

Se remarcă o creștere a pantei dreptei (față de cinetica normală), intersecta cu ordonata nefiind modificată. Valorile modificate ale intersectiei prelungirii dreptei cu abscisa și panta dreptei sînt date în figură.

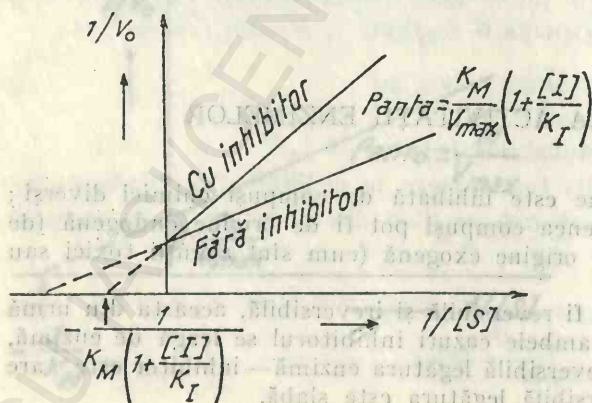
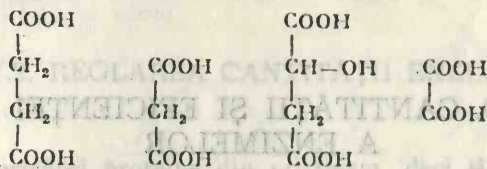


Fig. II.15 — Reprezentarea grafică a ecuației Lineweaver-Burk în cazul inhibiției competitive.

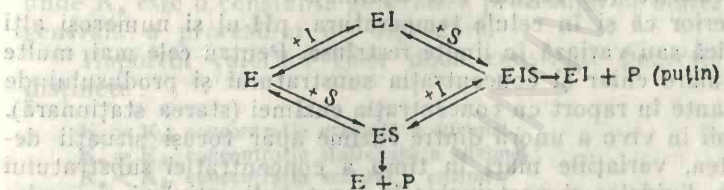


Competiția dintre substrat și inhibitor pentru ocuparea centrului activ se explică prin structurile lor apropiate (fig. 11.5 și 11.6). Astfel succinatdehidrogenaza, enzimă ce catalizează transformarea acidului succinic în acid fumaric, este inhibată de acizi dicarboxilici ca acizii malonic, malic și chiar oxalic :

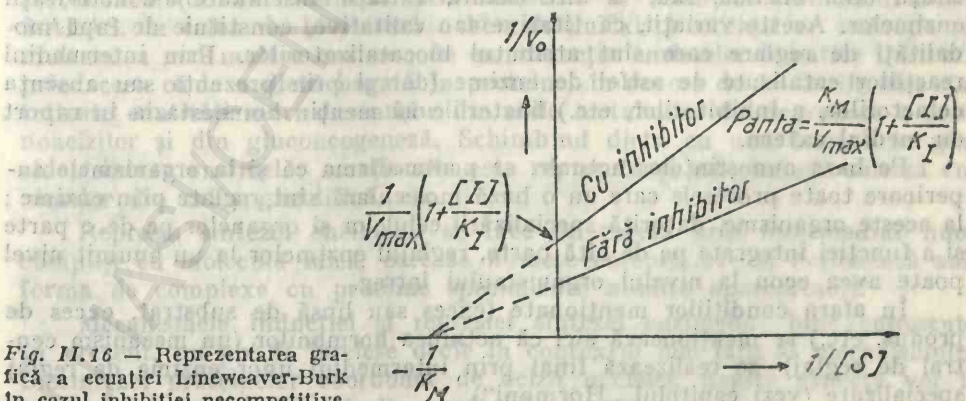


b) inhibiția necompetitivă : în acest caz, inhibitorul, a căru structură diferă de regulă destul de mult de structura substratului, se leagă în alt loc decît centrul activ al enzimei. Afinitatea pentru substrat a enzimei care are fixat inhibitorul este doar diminuată, probabil prin deformarea indusă la nivelul centrului activ. Cunoșcînd semnificația lui  $K_M$ , se înțelege ușor că în acest tip de inhibiție valoarea ei nu se modifică.

Reacțiile care au loc în sistemul ce conține enzima, substratul și inhibitorul necompetitiv sînt :



Dacă se studiază cinetica unei asemenea reacții, reprezentarea  $1/v_0$  în funcție de  $1/[S]$  conduce la o dreaptă a cărei prelungire intersecțează abscisa în același punct cu dreapta obținută fără inhibitor ; în schimb, sînt modificate intersecția cu ordonata și panta. Aspectul dreptei și valorile corespunzătoare sînt redate în fig. 11.16.



Ca exemplu menționăm unele enzime care conțin grupări SH libere în alte poziții decât centrul activ. Aceste grupări pot fixa — prin legături slabe — ioni ai unor metale grele cum sînt  $\text{Ag}^+$  și  $\text{Hg}^{2+}$ ; după caz, fixarea induce sau nu modificări în capacitatea enzimei de legare a substratului. Așa se explică efectul otrăvitor al multor cationi ai metalelor grele.

## II.7. REGLAREA CANTITĂȚII ȘI EFICIENȚEI CATALITICE A ENZIMELOR

### II.7.1. ASPECTE GENERALE

Înșușirile biocatalizatorilor între care capacitatea catalitică deosebită, specificitatea, inhibarea prin diverși compuși, etc., au fost studiate în detaliu pe soluții apoase ale enzimelor (care au fost în prealabil extrase și purificate); în aceste condiții atunci cînd se studiază acțiunea unui anumit factor, de ex. a unui inhibitor, ceilalți parametri cum sînt concentrația enzimei, a substratului, prezența în limitele necesare a cofactorilor etc., se mențin în limitele dorite (de regulă cele optime).

S-a arătat anterior că și în celule temperatura, pH-ul și numeroși alți factori nu se modifică sau variază în limite restrînse. Pentru cele mai multe dintre enzimele celulare chiar și concentrația substratului și produsului de reacție rămîn constante în raport cu concentrația enzimei (starea staționară).

În cazul acțiunii in vivo a unora dintre enzime apar totuși situații deosebite; între acestea, variațiile mari în timp a concentrației substratului (de ex. a glucidelor, lipidelor și proteinelor în tractul digestiv) și acumularea peste limite a produsului de reacție, sînt cele mai frecvente.

Cum se adaptează la astfel de situații organismul viu (celulă, organ, organismul întreg)?

Răspunsul la această întrebare a venit mai întîi din studiul unor procese metabolice la organisme simple (bacterii) la care s-au remarcat, funcție de condițiile create în mediu, creșteri și scăderi în limite foarte mari ale cantității unor enzime, sau, în alte cazuri, variații însemnate ale activității enzimelor. Aceste variații, cantitative sau calitative, constituie de fapt modalități de reglare care sînt atributul biocatalizatorilor. Prin intermediul reacțiilor catalizate de astfel de enzime (dar și prin prezența sau absența cofactorilor, a inhibitorilor, etc.) bacteriile își mențin homeostazia în raport cu mediul extern.

Pe baza cunoștințelor actuale, se poate afirma că și la organismele superioare toate procesele care au o bază moleculară sînt reglate prin enzime; la aceste organisme, datorită specializării celulelor și organelor pe de o parte și a funcției integrate pe de altă parte, reglajul enzimelor la un anumit nivel poate avea ecou la nivelul organismului întreg.

În afara condițiilor menționate (exces sau lipsă de substrat, exces de produs, etc.) se menționează aici că acțiunea hormonilor (un mecanism central de reglaj) se realizează final prin intermediul unor enzime de reglaj specializate (vezi capitolul „Hormoni“).

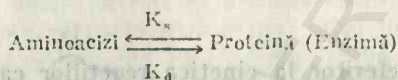


În cele ce urmează se prezintă reglarea cantității enzimelor (pe scurt) și cele două variante majore de reglare a activității enzimelor: reglarea alosterică și reglarea covalentă.

## II.7.2. REGLAREA CANTITĂȚII ENZIMELOR

Cantitatea oricărei proteine din organism, deci și a enzimelor, rezultă din dinamica proceselor de biosinteză și degradare. Viteza de schimb (turnoverul) proteinelor, exprimată prin timpul de înjumătățire,  $T_{1/2}$ , este foarte variată (vezi „Metabolismul proteinelor și al aminoacizilor”).

Se știe că proteinele se sintetizează din aminoacizi; pe de altă parte, produșii de degradare a proteinelor sînt de asemenea aminoacizii. Se poate deci scrie relația:



unde  $K_s$  este o constantă generală a procesului de sinteză iar  $K_d$  o constantă generală a procesului de degradare.

Raportul valorilor celor două constante generale relevă trei situații distincte:

$K_s > K_d$ , concentrație crescută a enzimei;

$K_s = K_d$ , concentrație staționară a enzimei;

$K_s < K_d$ , concentrația scăzută a enzimei.

Majoritatea enzimelor au  $K_s = K_d$ ; ele se numesc enzime constitutive. Enzimele la care  $K_s > K_d$  se numesc „inductibile”, cele la care  $K_s < K_d$  se numesc „represibile”. Se face precizarea că inducția sau represia sintezei enzimelor nu au caracter permanent și că la o aceeași enzimă inducția sintezei alternează cu represia acesteia în funcție de necesitățile de moment.

Inducția sintezei se poate restringe la o singură enzimă dintr-o cale metabolică (de ex. inducția prin substrat a  $\delta$ -aminolevulinatsintetazei,  $\delta$ -ALAS, în calea de biosinteză a hemului). Există situații de inducție simultană a mai multor enzime; de ex. inducția enzimelor hepatice ilustrată prin aceea că la o dietă bogată în proteine, în decurs de 1—2 zile sînt sintetizate cantități mari de enzime din căile metabolice de degradare a aminoacizilor și din gluconeogeneză. Schimbînd dieta cu una bogată în glucide, sinteza enzimelor menționate este represată și este indusă sinteza enzimelor din calea glicolitică, etc.

Represia sintezei enzimelor se face de regulă prin intermediul unor compuși cu moleculă mică, care se numesc corepresori; ei acționează sub forma de complexe cu proteine specializate numite aporepresori.

Mecanismele inducției și represiei sintezei enzimelor, bine cunoscute în prezent, nu pot fi înțelese decît în contextul mai larg al mecanismului biosintezei proteinelor coordonat de acizii nucleici. Aceste aspecte vor fi tratate pe larg într-unul din capitolele următoare.

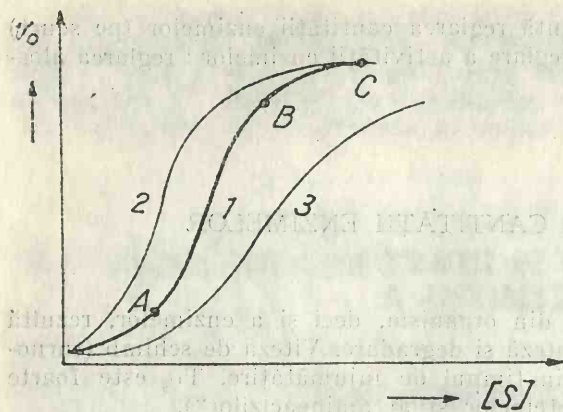


Fig. II.17 — Representarea grafică a variației lui  $v_0$  în funcție de  $S$  pentru enzimele alosterice : 1) cu efect homotrop ; 2) cu efect heterotrop, în prezența modulatorilor pozitivi ; 3) cu efect heterotrop, în prezența modulatorilor negativi (comentarii în text).

### II.7.3. REGLAREA ALOSTERICĂ A ACTIVITĂȚII ENZIMELOR

În subcapitolul referitor la cinetica reacțiilor catalizate de enzime s-a menționat că pentru unele dintre acestea curba variației lui  $v_0$  în funcție de  $[S]$  nu este o hiperbolă ci are un aspect sigmoidal (fig. II.17, curba 1).

Viteza mică a reacției enzimatice la început, urmată de creșterea abruptă la concentrații mai mari ale substratului, sînt rezultatul unui mecanism particular de acțiune. Hotărîtoare pentru elucidarea acestui mecanism au fost cercetările efectuate de J. Monod, J. P. Changeux și F. Jacob asupra unor enzime din celule bacteriene cultivate în medii propice. S-a constatat de exemplu că în calea metabolică de biosinteză a L-izoleucinei din L-treonină (care constă din cinci reacții catalizate de tot atîtea enzime), L-izoleucina devine, atunci cînd se acumulează peste anumite limite (sau cînd se adaugă L-izoleucină în mediu), un puternic inhibitor al L-treonin-dehidratazei, enzima ce catalizează transformarea L-treoninei în  $\alpha$ -cetobutirat + amoniac (fig. II.18).

Studiind și alte căi de biosinteză, Monod și colab. au fost în măsură să generalizeze că produsul final, acumulat peste necesitățile de moment, devine inhibitor al enzimei care catalizează prima din șirul reacțiilor implicate în biosinteză (fig. II.19.a).

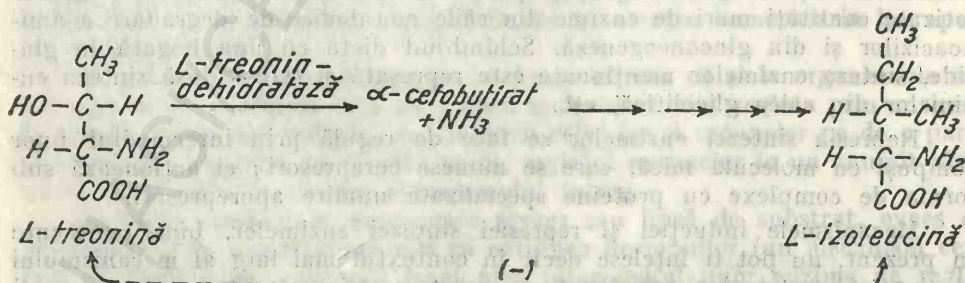
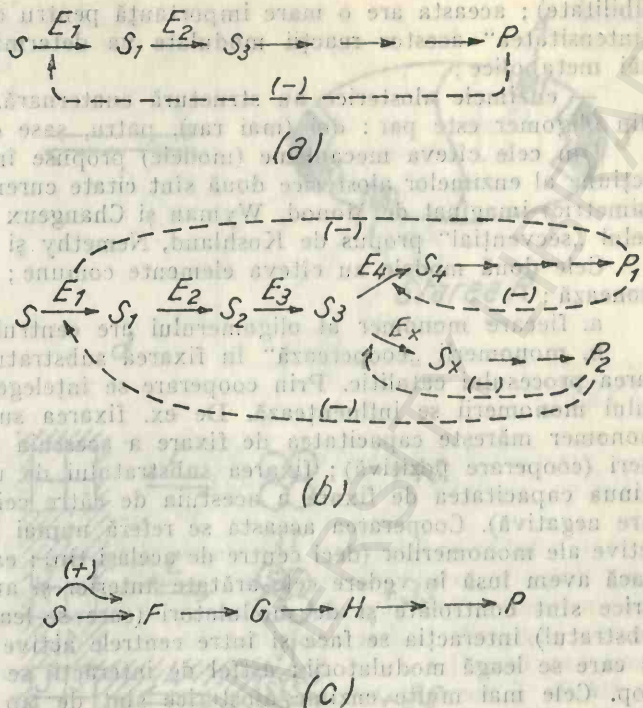


Fig. II.18 — Inhibarea activității L-treonindehidratazei de către L-izoleucină.



Fig. II.19 — Modularea activității enzimelor alosterice: (a) inhibiție feedback într-o cale metabolică lineară; (b) inhibiții feedback în căi metabolice cu ramificații; (c) modulare pozitivă (Feedforward stimulation).



Acest tip de inhibiție s-a numit inhibiție prin produs final, inhibiție de tip feedback sau retroinhibiție; enzimele inhibitate s-au numit „enzime alosterice“.

În cazul căilor metabolice cu ramificații, s-a constatat că produșii finali sînt inhibitori ai enzimelor care catalizează reacțiile la nivelul ramificațiilor; deseori, fiecare dintre produșii finali inhibă și activitatea primei enzime (fig. II.19.b). Produșii finali cu efect inhibitor s-au numit modulatori negativi sau inhibitori alosterici.

Au fost identificate și enzime alosterice a căror activitate crește în prezența unor compuși, care au fost denumiți modulatori pozitivi activatori alosterici (ex. substratul în fig. II.19.c).

Deoarece modulatorii, inclusiv substratul, schimbă activitatea enzimei ca urmare a legării de aceasta, ei se denumesc cu termenul comun de liganzi.

Termenii enzime alosterice, activatori și inhibitori alosterici, au fost introduși de Monod și colab., în legătură cu faptul că locul de fixare pe enzimă al acestora este altul decît centrul activ (allo = alt).

Inhibările și activările enzimelor alosterice sînt uneori mai complicate; un caz este al inhibiției prin mai mulți modulatori, altul cînd pentru enzima alosterică există atît modulatori pozitivi cît și negativi.

În legătură cu enzimele alosterice sînt esențiale și alte două constatări: — reacțiile catalizate de aceste enzime au  $\Delta G^\circ$  negativ (vezi „Energetică biochimică“), ele sînt deci ireversibile (sau cu grad redus de rever-

sibilitate); aceasta are o mare importanță pentru căile metabolice întrucât „intensitatea” acestor reacții modulate va determina intensitatea întregii căi metabolice;

— enzimele alosterice au structură cuaternară. Numărul monomerilor din oligomer este par: doi (mai rar), patru, șase etc.

Din cele câteva mecanisme (modele) propuse în legătură cu modul de acțiune al enzimelor alosterice două sînt citate curent: modelul „concertat” (simetric) imaginat de Monod, Wyman și Changeux (modelul MWC) și modelul „secvențial” propus de Koshland, Nemethy și Filmer (modelul KNF).

Cele două modele au câteva elemente comune; dintre acestea se menționează:

a. fiecare monomer al oligomerului are centrul său activ;

b. monomerii „cooperează” în fixarea substratului și deci în desfășurarea procesului catalitic. Prin cooperare se înțelege că la fixarea substratului monomerii se influențează. De ex. fixarea substratului de către un monomer mărește capacitatea de fixare a acestuia de către ceilalți monomeri (cooperare pozitivă); fixarea substratului de un monomer poate diminua capacitatea de fixare a acestuia de către ceilalți monomeri (cooperare negativă). Cooperarea aceasta se referă numai la interacțiunile centrelor active ale monomerilor (deci centre de același tip); ea este de tip homotrop. Dacă avem însă în vedere cele arătate anterior și anume că enzimele alosterice sînt controlate și de modulatori (care se leagă în alte poziții decît substratul) interacția se face și între centrele active și centrele (locusurile) pe care se leagă modulatorii; astfel de interacții se numesc de tip heterotrop. Cele mai multe enzime alosterice sînt de tip mixt, homotrop-heterotrop.

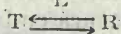
c. Interacțiunile între monomeri în oligomer nu implică modificări profunde (formare sau rupere de legături covalente). Din acest motiv și prin faptul că modulatorii alosterici sînt compuși chimici aflați curent în fondul metabolic celular (dar care prezintă fluctuații din punct de vedere al concentrației), reglarea alosterică se face cu consum minim de energie.

Modelul simetric postulează suplimentar:

— oligomerul este simetric, deci centrele active ale monomerilor sînt echivalente;

— conformația fiecărui monomer este „constrînsă” de asociația cu ceilalți monomeri;

— oligomerul poate exista numai în două stări (conformații): conformația T (tensionată, constrînsă), cu afinitate mică față de substrat și conformația R (relaxată), cu afinitate mare pentru substrat. Cele două stări se află în echilibru, constanta de echilibru fiind L (constantă alosterică). Termenii T și R se referă la flexibilitatea oligomerului:



— dacă se consideră numai interacția de tip homotrop, fixarea substratului la starea T chiar a unui singur monomer (care se realizează cu dificultate avînd în vedere afinitatea scăzută, vezi fig. II.17, porțiunea O—A pe curba 1), induce o modificare conformațională concertată a tuturor monomerilor (pentru a se păstra simetria). Cu cît echilibrul  $T \rightleftharpoons R$  este mai mult deplasat spre R cu atît fixarea substratului se produce mai ușor, justificîndu-se astfel cooperativitatea (fig. II.17, porțiunea A—B; porțiunea B—C



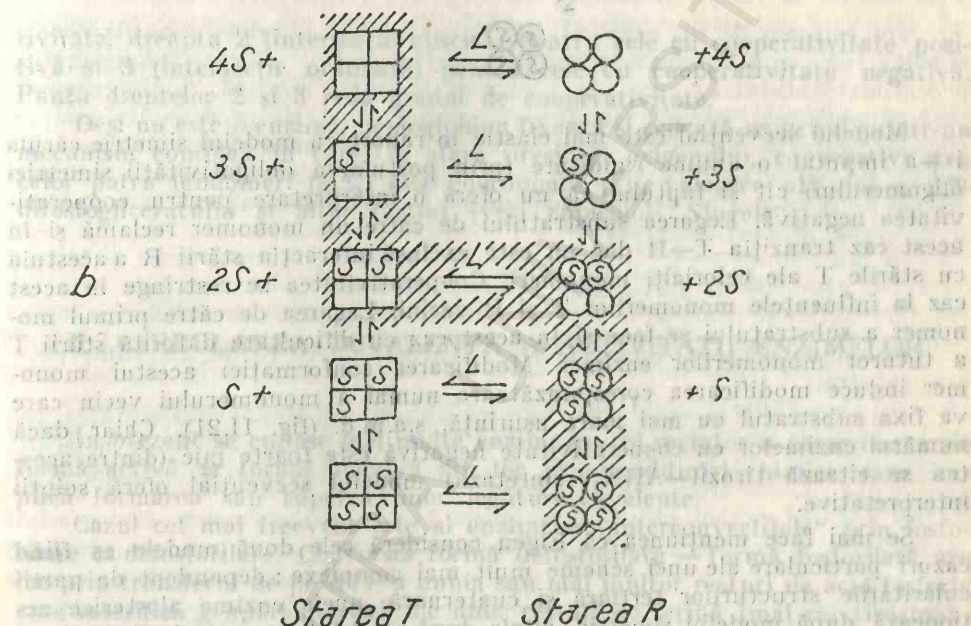
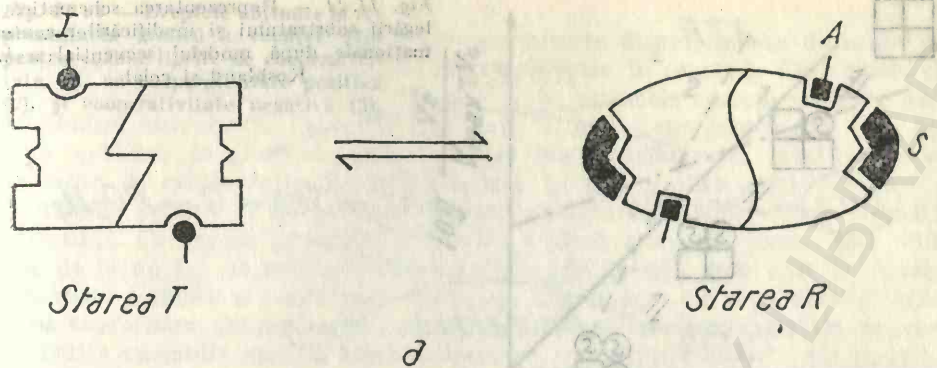
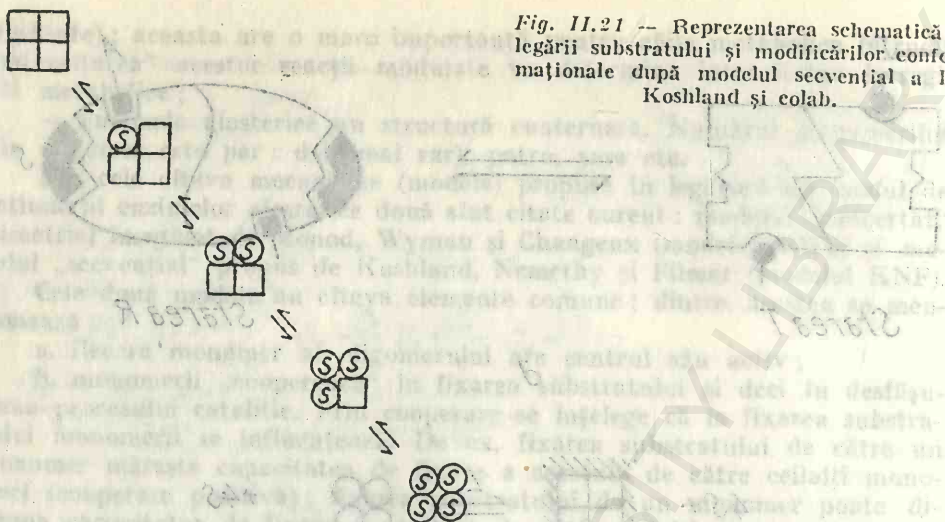


Fig. II.20 — Modelul „simetric” propus de Monod și colab. pentru mecanismul de acțiune a enzimelor alosterice: a) stările R și T pentru o enzimă alosterică formată din două subunități (starea T are fixat inhibitorul (I), starea R are fixat substratul (S) și activatorul (A) ; b) stările posibile pentru o enzimă alosterică cu patru subunități și fixarea de către aceasta a substratului.

corespunde saturării cu substrat). La o enzimă alosterică formată din patru monomeri stările posibile și legarea substratului sînt reprezentate în fig. II.20. Din aceste stări, probabilitatea maximă o au cele care se află în zona hașurată.

— la enzimele heterotrope, efectul modulatorilor se suprapune peste cel al substratului. Cei pozitivi (activatorii) stabilizează conformația R, deci ei favorizează deplasarea echilibrului  $T \rightleftharpoons R$  spre dreapta ; cei negativi (inhibitorii) stabilizează conformația T (curbele 2 și 3 pe fig. II.17).

Fig. II.21 -- Reprezentarea schematică a legării substratului și modificărilor conformaționale după modelul secvențial a lui Koshland și colab.



Modelul secvențial este mai elastic în raport cu modelul simetric căruia i s-a imputat o anumită rigiditate (prin postularea obligativității simetriei oligomerului) cât și faptului că nu oferă o interpretare pentru cooperativitatea negativă. Legarea substratului de către un monomer reclamă și în acest caz tranziția  $T \rightarrow R$  dar nu este exclusă interacția stării  $R$  a acestuia cu stările  $T$  ale celorlalți monomeri. Cooperativitatea se restringe în acest caz la influențele monomerilor  $T$  și  $R$  vecini. Legarea de către primul monomer a substratului se face și în acest caz cu dificultate datorită stării  $T$  a tuturor monomerilor enzimei. Modificarea conformației acestui monomer induce modificarea corespunzătoare numai a monomerului vecin care va fixa substratul cu mai mare ușurință, ș.a.m.d. (fig. II.21). Chiar dacă numărul enzimelor cu cooperativitate negativă este foarte mic (dintre acestea se citează tirozil-ARN<sub>t</sub>-sintetaza) modelul secvențial oferă soluții interpretative.

Se mai face mențiunea că Eigen consideră cele două modele ca fiind cazuri particulare ale unei scheme mult mai complexe; dependent de particularitățile structurilor terțiară și cuaternară, unele enzime alosterice acționează după modelul simetric, altele după modelul secvențial, altele după modelul generalizat.

Sub aspect cinetic, Hill a stabilit o ecuație cu valabilitate atât pentru enzimele Michaeliene cât și pentru cele alosterice:

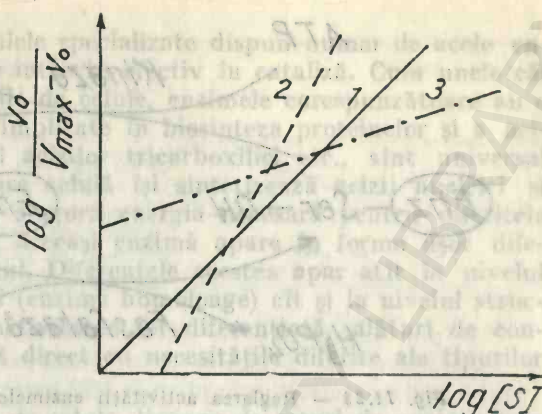
$$\log \frac{v_0}{V_{\max} - v_0} = n_H \cdot \log [S] - \log K$$

unde  $v_0$ ,  $V_{\max}$  și  $[S]$  au semnificațiile cunoscute,  $K$  este o constantă specifică pentru interacția enzimă-ligand;  $n_H$  este „coeficientul Hill“, o constantă empirică care reflectă atât numărul locusurilor de fixare a liganzilor cât și intensitatea interacțiunii acestora.

Reprezentînd grafic pe abscisă și ordonată valorile date în fig. II.22 se obține dreapta 1 (pornind din origine) pentru enzime lipsite de coopera-



Fig. 11.22 — Dreptele obținute la reprezentarea grafică a ecuației Hill pentru enzime lipsite de cooperativitate (1), cu cooperativitate pozitivă (2), și cooperativitate negativă (3).



tivitate, dreapta 2 (intersecție abscisă) pentru cele cu cooperativitate pozitivă și 3 (intersecție ordonată) pentru cele cu cooperativitate negativă. Panta dreptelor 2 și 3 redă gradul de cooperativitate.

Deși nu este o enzimă, hemoglobina fixează și cedează oxigenul printr-un mecanism complex în care, în afara presiunii oxigenului, cooperativitatea celor patru monomeri ( $\alpha_2\beta_2$ ) este coordonată prin valoarea pH-ului, a 2,3-difosfogliceratului și altor factori (vezi capitolul „Single”).

#### 11.7.4. REGLAREA COVALENTĂ A ACTIVITĂȚII ENZIMELOR

În prezent se cunosc mai multe enzime cu rol reglator a căror conversie formă activă  $\rightleftharpoons$  formă inactivă are loc prin modificări chimice care implică formarea sau ruperea unor legături covalente.

Cazul cel mai frecvent este al enzimelor „interconvertibile” prin fosforilare  $\rightleftharpoons$  defosforilare. Conversia formă defosforilată  $\rightarrow$  formă fosforilată are loc prin transferul de pe ATP a unui sau mai multor resturi de acid fosforic care esterifică grupări hidroxil ale unor resturi de serină (mai rar tirozină); fosforilarea se face cu mare exactitate la anumite resturi de serină, niciodată la cele care fac parte din centrul activ al enzimei. Fosforilările sînt catalizate de kinaze specifice, care, la rîndul lor pot exista în forme fosforilate numite fosfokinaze și defosforilate numite defosfokinaze (fig. 11.23). Fînd puternic exergonice, reacțiile de fosforilare sînt ireversibile. Transformarea inversă, formă fosforilată  $\rightarrow$  formă defosforilată se face hidrolitic, în prezența unor fosfataze specifice; și aceste reacții sînt ireversibile.

Enzimele interconvertibile apar numai în celulele organismelor superioare. După caz, unele enzime interconvertibile sînt active în forma fosforilată (glicogenfosforilaza), altele sînt active în forma defosforilată (glicogensintetaza); activarea lor prin fosforilare (defosforilare) este etapa ultimă într-o cascadă de evenimente declanșată odată cu fixarea de către celule a unor hormoni sau alți compuși chimici cu rol reglator. Aceste mecanisme sînt tratate pe larg în capitolul „Hormoni”.

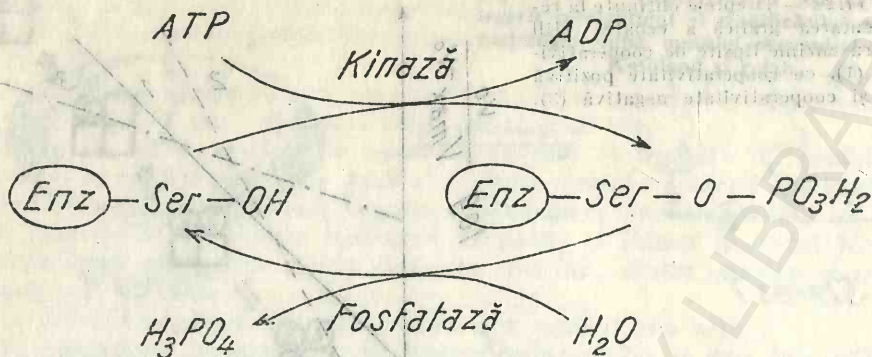
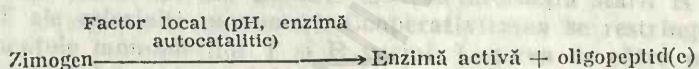


Fig. II.23 — Reglarea activității enzimelor prin fosforilare-defosforilare.

Tot activări de tip covalent pot fi considerate și transformările proenzimelor de tipul perpsinogenului, tripsinogenului, chimotripsinogenului, procarboxipeptidazelor, etc. în enzimele pepsină, tripsină, chimotripsină, carboxipeptidază. Formele inactive (zimogeni) sînt cele produse la locul de sinteză (mucoasa gastrică pentru pepsinogen, pancreasul pentru toate celelalte); activările se produc la locul de acțiune (stomac, intestinul, subțire). Aceste activări au loc atît sub acțiunea unor factori locali cît și autocatalitic, după schema generală:



Prin îndepărtarea oligopeptidelor, centrele active devin accesibile pentru substrat.

Transformările acestea sînt unidirecționale, nu există posibilitatea refacerii zimogenului din enzimele active. Modalitățile particulare de activare a acestor enzime se pot urmări în capitolul „Metabolismul proteinelor și al aminoacizilor“.

## II.8. LOCALIZAREA INTRACELULARĂ A ENZIMELOR

Pe măsură ce cunoștințele privind structura celulelor în general și particularitățile celulelor specializate din organele și țesuturile organismelor superioare s-au amplificat, imaginea distribuției haotice a enzimelor în interiorul acestora (celulele sînt „saci cu enzime“) datînd din secolul trecut, a fost înlocuită cu una diametral opusă.

Separarea prin ultracentrifugare a organelor celulare urmată de identificarea prin tehnici histochemice și biochimice a enzimelor a constituit metodologia care a asigurat tabloul complex al cunoștințelor de care dispunem în prezent referitor la localizarea intracelulară a enzimelor.



Un prim aspect este că celulele specializate dispun numai de acele enzime (sau seturi de enzime) care intervin efectiv în cataliză. Cum unele căi metabolice au loc în toate tipurile de celule, enzimele corespunzătoare au o răspândire ubiquitară. Enzimele implicate în biosinteza proteinelor și a acizilor nucleici, în glicoliză, ciclul acizilor tricarboxilici etc., sînt universal prezente în celule întrucît fiecare celulă își sintetizează acizii nucleici și proteinele proprii și își produce singură energia necesară pentru diferitele activități. Ca regulă generală, o aceeași enzimă apare în forme ușor diferite de la un tip de celule la altul. Diferențele acestea apar atît la nivelul structurii primare și conformației (enzime homoloage) cît și la nivelul structurii cuaternare (izoenzimele); activitatea lor diferențiată, alături de concentrația variabilă sînt în raport direct cu necesitățile diferite ale tipurilor de celule.

Pe de altă parte, fiecare tip de celule dispune de seturi de enzime care catalizează reacțiile din căile metabolice specifice: enzimele implicate în biosinteza hormonilor tiroidieni se află numai în tiroidă, cele care participă la biosinteza ureei se află numai în ficat etc.

Un al doilea aspect privește chiar locul în care diversele enzime se află într-o celulă dată; el coincide, evident, cu locul de desfășurare a căii metabolice din care face parte reacția pe care o catalizează: glicoliza se desfășoară numai în citoplasmă, deci toate enzimele acestei căi se află în porțiunea reticulată a citoplasmei; biosinteza ureei (în hepatocite) se desfășoară parțial în citoplasmă și parțial în mitocondrii deci unele enzime ale acestei căi sînt citoplasmatic, altele mitocondriale. Un caz aparte este al enzimelor sintetizate de celule specializate din diferite organe, locul de acțiune fiind în afara celulelor (enzimele plasmatic funcționale, enzimele care asigură digestia glucidelor, lipidelor și proteinelor alimentare etc.).

Unele enzime au localizare dublă: aspartat aminotransferaza (ASAT = GOT) cît și izocitratdehidrogenaza (ICDH) se află atît în citoplasmă cît și în mitocondrii. ICDH citoplasmatică are coenzimă NADP<sup>+</sup>, cea din mitocondrii are NAD<sup>+</sup>; rolul principal al ICDH mitocondriale este în cadrul ciclului acizilor tricarboxilici. ICDH citoplasmatică, în relație cu cea mitocondrială, asigură transferul „echivalenților de reducere” prin membrana mitocondrială (vezi metabolisme).

Multe enzime se află atașate de membrane: astfel adenilatciclaza este inclusă chiar în membrana citoplasmatică. Mitocondriile, organite celulare înzestrate cu două membrane, se caracterizează printr-o distribuție foarte complexă a enzimelor, așa cum rezultă din tabelul II.3.

Tabel II.3

**Localizarea unor enzime în mitocondriile celulelor hepatice**

Membrana externă	Monoaminoxidaza (MAO)
	Acil-CoA sintetaza
	Fosfolipaza A <sub>2</sub>
	Nucleoziddifosfatkinaza

Spațiul dintre membrane	Adenilat kinaza
-------------------------	-----------------

Membrana internă	NADH dehidrogenaza Citocromi (b, c, c <sub>1</sub> , aa <sub>3</sub> ) Succinat dehidrogenaza
	Citrat sintetaza Izocitrat dehidrogenaza (ICDH)
Matrix	Fumaraza Glutamat dehidrogenaza Enzimele de oxidare ale acizilor grași

S-a mai menționat că uneori enzimele care catalizează reacțiile unei căi metabolice sînt organizate în complexe multienzimatice (de ex. complexul multienzimatic al piruvat dehidrogenazei sau complexele lanțului respirator).

Aceste complexe sînt atașate sau chiar incluse în membrane. Fiecare enzimă este strict poziționată în raport cu cele care catalizează reacția anterioară și care urmează. Consecința este eficiența crescută a căii metabolice, fenomen denumit alotopie. Reglarea activității adenilatciclazei, enzimă inclusă în membrana citoplasmatică, este un asemenea complex (vezi capitolul „Hormoni”). Un caz și mai elocvent îl reprezintă lanțul respirator alcătuit din patru complexe; toate incluse în membrana internă mitocondrială (cap. „Metabolism energetic”).

## II.9. RELATIA DINTRE ENZIME ȘI PATOLOGIE

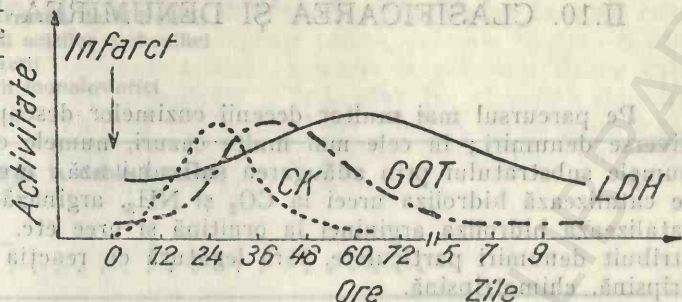
S-a constatat că în ser sînt prezente multe enzime. Pentru puține dintre acestea există însă și substratele corespunzătoare, deci majoritatea enzimelor din ser nu au rol catalitic la acest nivel.

Între enzimele care catalizează reacții în ser se menționează lipoproteinlipaza, pseudocolinesteraza, lecitin-colesterol-aciltransferaza (LCAT), cele implicate în coagulare și fibrinoliză etc., toate fiind sintetizate de ficat și secretate activ în singe. Ele se numesc enzime plasmatice funcționale. În afecțiuni grave ale ficatului, celulele hepatice sînt incapabile să sintetizeze normal proteine astfel încît activitatea acestor enzime, care în mod normal este relativ ridicată, va scădea.

Prezența în ser, obișnuit în cantități foarte mici, a enzimelor care nu au rol catalitic la acest nivel și care se numesc enzime plasmatice nefuncționale, se explică fie prin modificări de permeabilitate ale membranelor celulelor care le produc (de ex. în cursul efortului), fie prin distrucția celulară normală (fiziologică). În stări patologice, caracterizate prin distrucții masive a celulelor producătoare (de ex. a celulelor hepatice în hepatite și ciroze, a celor din mușchiul cardiac în infarctul de miocard etc.), concentrația (activitatea) lor în ser crește, uneori foarte mult. De aceea dozarea activității lor în ser este extrem de utilă medicilor în precizarea diagnosticului cit și în urmărirea evoluției bolii. De ex. după infarctul de miocard crește activitatea serică a CPK, GOT și LDH. Cea mai rapidă creștere se semna-



Fig. 11.24 — Variația activității unor enzime serice după infarctul de miocard.



lează în cazul CPK, cea mai lentă la LDH. Creșterea activității serice a oricăreia dintre aceste enzime poate fi utilă în precizarea diagnosticului.

Situația este diametral opusă în ce privește durata de revenire a activității acestor enzime serice la valorile bazale (normale); din acest motiv, evoluția bolii se urmărește cel mai bine prin LDH (fig. 11.24).

Problemele puse de investigarea paraclinică prin intermediul activității enzimelor serice sînt totuși extrem de complexe. Dificultățile provin în primul rînd din faptul că cele mai multe enzime plasmatice nefuncționale (a căror activitate se poate determina) au proveniență multiplă: LDH și GOT din inimă, mușchi, ficat, CPK din inimă și mușchii scheletici etc. Există și situații cînd enzima serică, fiind de proveniență unică, are activitate crescută doar în unele afecțiuni: sorbitol-dehidrogenaza și ornitin carbamiltransferaza (OCT) pentru afecțiuni hepatice; uneori, chiar dacă proveniența nu este unică, creșterea semnificativă a activității are loc numai în anumite cazuri (fosfataza acidă în carcinomul de prostată metastazat). Complicații apar și din alte motive: unele enzime se inactivează foarte repede în ser, determinarea activității reclamă metode sofisticate etc.

Prin diverse strategii, medicul și laboratorul de biochimie pot obține totuși rezultate mult mai certe. Se menționează determinarea simultană a mai multor enzime serice și calculul unor raporturi (de ex. raportul De Rittis între GOT/GPT care scade sub 1,3 în afecțiuni hepatice etc.), dozarea activității enzimelor pe țesuturi (recoltate prin biopsie, mai rar practică). De mare valoare sînt determinările izoenzimelor obținute prin procedee de separare (pe coloană, electroforetic) sau prin inhibarea cu anticorpi specifici a unora dintre izoenzimele unei enzime date. Astfel predominanța în ser a formelor LDH<sub>1</sub> și LDH<sub>2</sub> este un indiciu foarte bun pentru infarct de miocard, în timp ce predominanța formei LDH<sub>5</sub> indică afecțiuni hepatice. În cazul CPK, creșterea în ser a activității totale paralel cu creșterea activității izoenzimei de tip MB este cauzată de infarctul de miocard (forma MB fiind de proveniență aproape strict miocardică).

Date mult mai numeroase și detaliate privind enzimele serice și relația lor cu patologia sînt prezentate în capitolul „Biochimia singelui”.

## II.10. CLASIFICAREA ȘI DENUMIREA ENZIMELOR

Pe parcursul mai multor decenii enzimelor descoperite li s-au atribuit diverse denumiri; în cele mai multe cazuri, numele enzimei se forma din numele substratului prin adăugarea sufixului *ază*: urează pentru enzima ce catalizează hidroliza ureei la  $\text{CO}_2$  și  $\text{NH}_3$ , arginază pentru enzima care catalizează hidroliza argininei la ornitină și uree etc. Altor enzime li s-au atribuit denumiri particulare, fără legătură cu reacția catalizată: pepsină, tripsină, chimotripsină.

Când numărul enzimelor cunoscute a crescut și s-au acumulat date despre structură, coenzime, mecanism de acțiune etc., s-a impus necesitatea unei clasificări raționale și introducerea unor denumiri bazate pe criterii, chimice care să evite confuziile. La propunerea comisiei de enzimologie Uniunea Internațională de Biochimie (IUB) a adoptat, în 1961, sistemul de clasificare și denumire științifică, utilizate și în prezent.

În sistemul de clasificare adoptat fiecare enzimă este încadrată într-o clasă și, în cadrul acesteia, într-o subclasă, în anumite cazuri și într-o subclasă. Clasele, subclasele, subsubclasele și enzimele individuale se notează în ordinea menționată, prin cifre despărțite prin puncte. Astfel sînt 6 clase de enzime, avînd în ordine numerele:

1. Oxidoreductaze

2. Transferaze

3. Hidrolaze

4. Liază

5. Izomeraze

6. Ligaze

Subclasele și subsubclasele sînt stabilite pe anumite criterii ca: tipul grupării sau legăturii care se modifică în cursul reacției, natura coenzimei, așa cum reiese din Tabelul II.4.

Tabel II.4

Clasificarea și denumirea internațională a enzimelor. Pentru oxidoreductaze s-au introdus și subsubclase și enzime individuale; pentru celelalte clase s-au introdus numai subclase

### 1. Oxidoreductaze (catalizează reacții de oxido-reducere)

#### 1.1. Acționînd asupra $>\text{CH}-\text{OH}$

##### 1.1.1. Acceptorul este $\text{NAD}^+$ și $\text{NADP}^+$

##### 1.1.1.1. Alcool: NAD-oxidoreductază

##### 1.1.2. Acceptorul este citocromul

#### 1.2. Acționînd asupra $>\text{C}=\text{O}$

#### 1.3. Acționînd asupra $>\text{C}=\text{CH}-$

### 2. Transferaze (catalizează reacții de transfer a unor grupări)

#### 2.1. Transferă grupări de un carbon

#### 2.2. Transferă grupări aldehidice sau cetonice

#### 2.3. Transferă grupări acil



3. Hidrolaze (catalizează reacții de hidroliză)

- 3.1. Hidrolizează esterii acizilor carboxilici
- 3.2. Hidrolizează tioesterii
- 3.3. Hidrolizează esterii monofosforici

4. Liazele (catalizează adăția la duble legături)

- 4.1. Adății la  $>C=C<$
- 4.2. Adății la  $>C=O$
- 4.3. Adății la  $>C=N-$

5. Izomerase (catalizează reacții de izomerizare)

- 5.1. Racemaze și epimeraze
- 5.2. Cis-trans izomerase
- 5.3. Oxidoreductaze intramoleculare

6. Ligaze (sintetaze, catalizează formarea de legături covalente paralel cu scindarea ATP)

- 6.1. Formare de legături C-O
- 6.2. Formare de legături C-S
- 6.3. Formare de legături C-N

Dacă se ia în considerație și numele sistematic adoptat, care include numele substratului, tipul reacției și coenzima (cînd este cazul), atunci fiecare enzimă are „codul” său specific după cum urmează:

E.C. 1.1.1.1. Alcool : NAD — oxidoreductază

E.C. 1.2.1.1. Formaldehid : NAD — oxidoreductaza

E.C. 2.7.3.2. ATP : creatin-fosfotransferaza

unde E.C. este prescurtarea de la Enzyme Commission.

Pentru uzul curent, IUB a introdus în cazul unor enzime și un „nume recomandat”, de obicei mai scurt. Astfel alcool : NAD-oxidoreductaza se numește și alcool-dehidrogenază iar ATP : creatin-fosfotransferaza se numește creatin-kinază (notată CPK, uneori CK). Numele recomandat corespunde de multe ori cu cel particular.

## Cap. III. VITAMINE ȘI COENZIME

### III.1. GENERALITĂȚI

Vitaminele sînt o categorie de substanțe indispensabile animalelor superioare, care nu pot fi sintetizate în organismul lor. Pentru acest motiv vitaminele trebuie să fie procurate de rația alimentară.

Numele de *vitamine* corespunde, pe de o parte, faptului că sînt indispensabile vieții („vita“), animalelor iar, pe de altă parte, constatării că primul compus cunoscut ca avînd această însușire prezintă în structura sa chimică o grupare amino (este „amină“).

În organismele animale vitaminele nu reprezintă materiale structurale, de felul principiilor imediate (proteine, glucide, lipide) și nu au valoare energetică dar împlinesc roluri funcționale importante. Într-adevăr, majoritatea vitaminelor sînt constituenți coenzimatici, participînd la multiple și variate reacții metabolice. Deși pentru îndeplinirea acestor roluri funcționale organismul omului are nevoie de cantități foarte mici de vitamine (cîteva miligrame sau chiar micrograme pe zi), rația alimentară trebuie să le procure regulat. Altfel ajung să se declanșeze anumite stări patologice specifice numite *avitaminoze*. Cînd nu sînt de lungă durată, avitaminozele pot fi suprimate prin administrarea de vitamine.

Este de remarcă că există și vitamine distincte din punct de vedere chimic care îndeplinesc aceleași funcții și a căror carență determină aceeași avitaminoză. Acestea se numesc *vitamere*. Spre exemplu, diverse vitamine antirahitice D sînt caracterizate, una în raport cu altă, drept vitamere; astfel încît în loc de *vitaminele D* se spune adesea *vitamerele D*.

În cuprinsul acestui capitol se va întîlni uneori termenul de *antivitamină* (sau *antivitamină*). Antivitamină este o substanță care acționează antagonistă vitaminelor și care produce efectele avitaminozelor respective. În principiu, fiecare vitamină poate avea una sau mai multe antivitamină.

### III.2. CLASIFICAREA VITAMINELOR

Deoarece se cunosc numeroase vitamine cu structuri chimice foarte variate, ele nu au putut fi clasificate conform structurii ci s-a fixat drept criteriu de clasificare o însușire fizică și anume solubilitatea.



Din punct de vedere al solubilității vitaminele se grupează în două categorii : *vitamine hidrosolubile* (cele cu molecule polare, solubile în apă) și *vitamine liposolubile* (cele cu molecule apolare, solubile în grăsimi). Prima categorie cuprinde vitaminele din complexul B (vitamina B<sub>1</sub>, vitamina B<sub>2</sub>, vitamina B<sub>6</sub>, vitamina PP, vitamina B<sub>12</sub>, acidul folic, biotina, acidul pantotenic) și vitamina C. A doua categorie, cea a vitaminelor liposolubile, cuprinde : vitamina A, vitamina D, vitamina E și vitamina K.

### III.3. VITAMINELE HIDROSOLUBILE

#### III.3.1. COMPLEXUL B

„Complexul B” este un grup de cel puțin 8 vitamine hidrosolubile (menționate la clasificare), care se găsesc împreună în natură și sînt într-o strînsă interrelație funcțională.

Sursele cele mai bogate în complex B sînt : drojdia de bere, ficatul, boabele cerealelor (inclusiv cortexul), legumele și produsele bacteriilor intestinale.

Cu excepția vitaminei B<sub>12</sub>, care se depozitează în ficat, celelalte vitamine din complexul B se mențin în circulație numai în cantitățile necesare funcțiilor biologice pe care le împlinesc, excesele fiind eliminate prin urină.

Vitaminele din complexul B iau parte la majoritatea proceselor prin care se procură energie în organism. Ele sînt substanțe implicate în metabolismul proteinelor, sînt necesare funcționării normale a sistemului nervos, sînt esențiale pentru menținerea tonusului muscular în tractul gastrointestinal și pentru păstrarea normală și buna funcționare a diverselor organe sau țesuturi (ficat, ochi, piele, păr). O rație alimentară completă procură necesarul de vitamine din complexul B pentru asigurarea împlinirii în bune condițiuni a tuturor funcțiilor metabolice și fiziologice menționate. Acest necesar crește în cazuri de infecții, stări de stres, consum excesiv de zaharuri, sarcină, alăptare.

Deficiența de vitamine cuprinse în complexul B se manifestă în moduri foarte variate : insomnie, nervozitate și, în cazuri mai grave, depresiune nervoasă, albirea și căderea părului, tulburări cutanate, lipsa poftei de mîncare, constipație, anemie, modificări la nivelul limbii (roșeață însoțită de aspect strălucitor, mărire de volum, neregularități pe suprafață).

Complexul vitaminic B este utilizat pentru tratamentul avitaminozelor caracteristice și în tratamentul altor boli care nu sînt avitaminoze B. Spre exemplu, în cazul supradozărilor de barbiturice, în psihoze alcoolice, sindrom Ménière, poliomielită, oboseală, lipsă de apetit, constipație, stări de greață și vomă.

### III.3.1.1. Vitamina B<sub>1</sub> (tiamina) și coenzima tiaminpirofosfat

Vitamina B<sub>1</sub> sau „tiamina“ se mai numește și „aneurină“. Numele de *tiamină* este în legătură cu constituția sa chimică: în moleculă conține *sulf* — aparținând unui nucleu *tiazolic* — și are un grup *amino*, fixat la un nucleu pirimidinic (vezi formula). Numele de *aneurină* se datorează activității sale antinevritice. Într-adevăr, lipsa vitaminei B<sub>1</sub> determină la păsări polinevrita aviară iar la om boala numită beri-beri, manifestată prin tulburări nervoase.

#### Constituție chimică și proprietăți

În structura moleculei de vitamină B<sub>1</sub> intră două nuclee heterociclice (pirimidinic și tiazolic). Ambele nuclee sînt substituite în anume poziții și sînt unite printr-o punte metilenic:

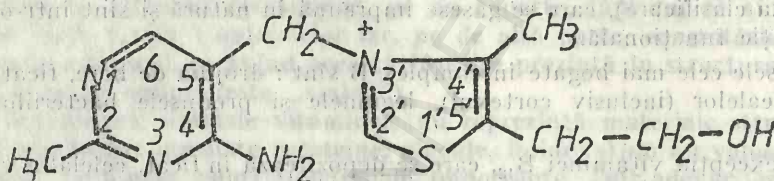


Fig. III.1 — Vitamina B<sub>1</sub>.

În soluții tiamina se află, sub formă de cation, iar în stare solidă ca sare (formată prin neutralizarea sarcinii pozitive de către un anion). Sub formă de sare, tiamina este o substanță solidă, cristalină, incoloră, solubilă în apă; este stabilă la încălzire dacă se află în stare anhidră. În soluții apoase, neutre sau alcaline, tiamina se descompune, dacă acestea sînt încălzite la fierbere; în soluții acide ( $pH < 5$ ) este mai stabilă. La temperatura obișnuită, tiamina nu se oxidează în aer. Dacă însă se alcalinizează soluția sa, apoasă și se tratează cu un oxidant (permanganat de potasiu sau fericianură de potasiu) tiamina se oxidează ușor trecînd în tiocrom, un produs cu fluorescență albastră. Pe această proprietate se bazează dozarea fluorimetrică a tiaminei din diverse produse biologice.

#### Răspîndire

Ca orice component al complexului B, tiamina se află în cantități apreciabile în drojdia de bere. De asemenea se găsește în cortexul și germenii boabelor de cereale (grîu, porumb, secară, orez), în legume (mazăre, fasole, sfeclă, spanac, lăptuci), în fructe (prune, struguri, nuci) și în carne (creier).

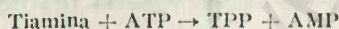


## Necesarul de tiamină

În medie, omul adult are nevoie de 2 mg vitamină B<sub>1</sub>/24 ore. Acest necesar zilnic este însă crescut la persoanele care depun o activitate musculară intensă și care au un consum mai mare de glucide ce trebuie metabolizate. În stări fiziologice particulare (sarcină, alăptare) se recomandă cantități de aproximativ trei ori mai mari. Nevoi suplimentare de vitamină B<sub>1</sub> se întâlnesc și în situații de stres, febră, diaree severă.

## Metabolism

Tiamina din alimentele care o conțin este absorbită rapid — după ingerare — la nivelul intestinului subțire. După trecerea în circulația sanguină este distribuită, în special, ficatului, rinichiului și inimii. Acestea sunt organe care au capacitatea de a transforma și combina molecula vitaminei B<sub>1</sub> cu resturi de acid fosforic și proteine specifice (în prezența ionilor Mn<sup>2+</sup>) pentru a se forma coenzime și enzime active în metabolismul glucidelor. Într-adevăr, în celulele diverselor organe și țesuturi tiamina se află sub formă de ester pirofosforic, tiaminpirofosfat (TPP), rezultat din reacția tiaminei cu ATP:



Această reacție este catalizată de enzima tiaminpirofosfokinaza, aflată, în special, în creier și ficat.

Structura chimică a tiaminpirofosfatului este:

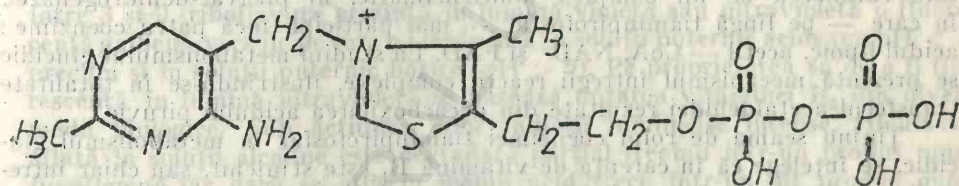


Fig. III.2. — Tiaminpirofosfatul.

## Coenzima tiaminpirofosfat

Tiaminpirofosfatul (numit uneori și *cocarboxilază*) este *coenzimă* în reacții enzimatiche de transfer ale unei unități de aldehydă activă. Asemenea transferuri au loc în reacția de decarboxilare oxidativă a  $\alpha$ -ceto-acizilor (piruvat,  $\alpha$ -ceto-glutarat) și în reacția de transcetolare. Ambele tipuri de reacții sunt întâlnite în cadrul metabolismului glucidic. În aceste reacții de transfer, rolul propriu-zis al coenzimei tiaminpirofosfat este de a servi la eliberarea din anumite molecule a unităților aldehydice care urmează a fi transferate pe alte molecule. Se ilustrează aici intervenția tiaminpirofosfatului în decarboxilarea acidului piruvic și formarea de acetaldehydă (in vitro).

Datorită poziției sale în ciclul tiazolic din tiaminpirofosfat,  $C_2$  este reactiv; în urma ionizării H legat de el devine  $H^+$  iar  $C_2$  carbanion. Acest carbanion exercită un atac nucleofil asupra  $C_2$  din molecula acidului piruvic. Ca urmare, rezultă un compus de adăiere al acidului piruvic la tiaminpirofosfat și care se decarboxilează, formându-se hidroxietil-tiaminpirofosfat. Ulterior, acesta eliberează molecula de acetaldehidă (rezultată din hidroxietilul format prin decarboxilarea acidului piruvic) și regenerează tiaminpirofosfatul:

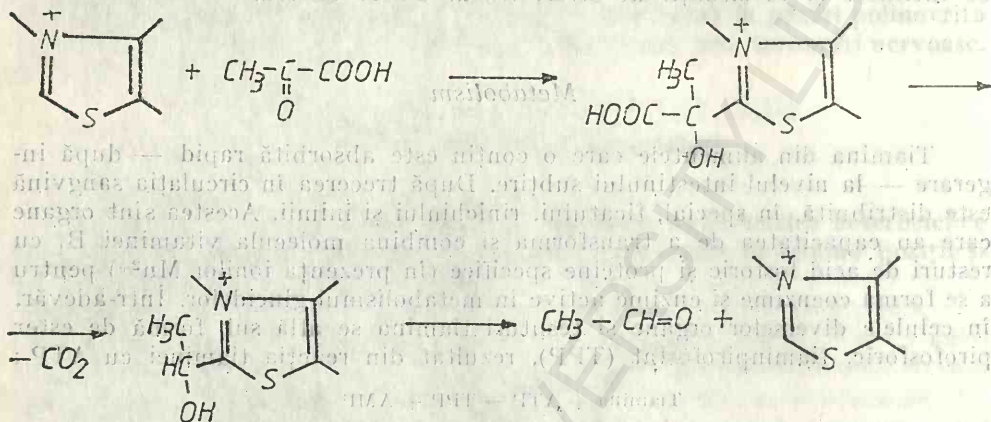


Fig. III.3 — Mecanismul decarboxilării acidului piruvic (in vitro).

În organism, această reacție-cheie de decarboxilare a acidului piruvic este catalizată de un complex multienzimatic, al piruvat-dehidrogenazei, în care — pe lângă tiaminpirofosfat — mai participă încă patru coenzime: acidul lipoic, acefi — CoA,  $NAD^+$  și FAD. La studiul metabolismului glucidic se prezintă mecanismul întregii reacții complexe, ilustrându-se în totalitate transferul acetaldehidei rezultate din decarboxilarea acidului piruvic.

Ținând seama de rolul coenzimei tiaminpirofosfat în metabolismul glucidic, se înțelege că în carența de vitamină  $B_1$  este stîrjenit, sau chiar întrerupt, acest proces atât de important din punct de vedere energetic. Acidul piruvic ajunge astfel să se acumuleze ca atare în organism, ceea ce atrage o serie de manifestări patologice determinate de avitaminoză  $B_1$ : crampe musculare, fenomene toxice pentru sistemul nervos, modificări cardiace, oboseală, iritabilitate, instabilitate emoțională, inflamația nervului optic, edeme. În deficiența de vitamină  $B_1$  însăși funcționarea sistemului nervos central suferă alterări deoarece aceasta depinde, în mare măsură, de energia eliberată prin degradarea glucozei. Pentru motive de același ordin, deficiența de vitamină  $B_1$  afectează și sistemul cardiovascular (mușchiul inimii își pierde tonicitatea) precum și tractul gastrointestinal, la nivelul căruia se instalează atonie musculară.

Este de remarcat că în deficiența de tiamină, pe lângă acidul piruvic, ajung să se acumuleze în organism și alte substraturi ( $\alpha$ -ceto-acizi sau pentoze) care în mod normal participă la reacții de decarboxilare sau transketolare prin intervenția coenzimei tiamin-pirofosfat. Acumularea acestor substraturi în cantități mai mari decît cele normale, antrenează diverse tulburări metabolice.



### III.3.1.2. Vitamina B<sub>2</sub> (riboflavină) și coenzimele flavinice

Vitamina B<sub>2</sub> se mai numește *riboflavină* datorită structurii sale de flavină (pigment galben) cu radical ribitol, provenit din ribitol (polialcoolul corespunzător ribozei). Vitaminei B<sub>2</sub> i se mai spune și *lactoflavină* deoarece este o flavină aflată în lapte.

#### Constituție chimică și proprietăți

Vitamina B<sub>2</sub> cuprinde în moleculă sa heterociclu izoaloxazinic substituit în pozițiile 6 și 7 cu câte un radical metil iar în poziția 9 cu radicalul ribitol:

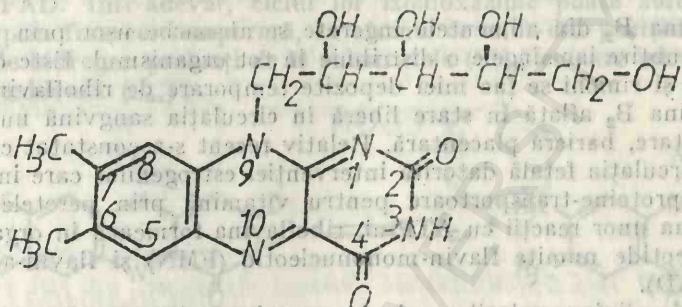


Fig. III.4 — Vitamina B<sub>2</sub>.

Riboflavina este o substanță solidă, cristalină, galbenă, puțin solubilă în apă și stabilă în soluții apoase. În asemenea soluții, cu pH-uri cuprinse între 3 și 9, riboflavina prezintă în lumină violetă sau ultravioletă o fluorescență galbenă-verzuie pe care o pierde însă în soluții puternic acide (cu pH < 3), precum și în soluții puternic bazice (pH > 9). Pe proprietatea sa de a fi fluorescentă în lumină ultravioletă se bazează dozarea vitaminei B<sub>2</sub> din diverse medii biologice. Sub acțiunea unor radiații luminoase intense, riboflavina aflată în soluții alcaline este degradată parțial trecând într-un produs numit *lumiflavină* iar dacă se află în mediu acid trece într-un alt produs numit *lumicrom*.

#### Răspîndire

Vitamina B<sub>2</sub> se află mult răspîndită în alimente de origine animală (lapte și produse lactate, ouă, carne) precum și în unele alimente de origine vegetală (tomate, mazăre).

#### Necesarul de vitamină B<sub>2</sub>

Se consideră că necesarul zilnic de vitamină B<sub>2</sub> al adultului este de 1,6 mg pentru bărbați și de 1,2 mg pentru femei. Gravidele au un necesar zilnic de 1,6 mg iar femeile care alăptează de 1,7 mg.

**Avitaminoza B<sub>2</sub>.** Când aportul de vitamină B<sub>2</sub> este insuficient apar simptomele avitaminozei corespunzătoare: ragade la colțurile gurii, leziuni ale buzelor, colorarea în roșu intens a limbii, oboseală oculară, dilatarea pupilei, sensibilizarea ochiului la lumină, modificări de vascularizație la nivelul corneei (eventual ulceratii), tremurături, tulburări digestive, dificultăți la urinare. Toate aceste simptome menționate dispar prin includerea sistematică și suplimentară în rație a unor alimente bogate în vitamină B<sub>2</sub> sau prin administrarea produselor farmaceutice cuprinzând riboflavină.

### Metabolism

Vitamina B<sub>2</sub> din alimentele ingerate se absoarbe ușor prin peretele intestinului subțire iar singele o distribuie în tot organismul. Este de remarcă că în ficat și rinichi se fac mici depozite temporare de riboflavină.

Vitamina B<sub>2</sub> aflată în stare liberă în circulația sangvină nu poate traversa, ca atare, bariera placentară. Relativ recent s-a constatat că ea ajunge totuși în circulația fetală datorită intervenției estrogenilor care induc biosinteza unei proteine-transportoare pentru vitamină prin peretele placentar.

În urma unor reacții cu ATP-ul, riboflavina formează în organism două flavin-nucleotide numite flavin-mononucleotid (FMN) și flavin-adenin-dinucleotid (FAD).

După împlinirea rolurilor sale în organism, vitamina B<sub>2</sub> este excretată prin urină.

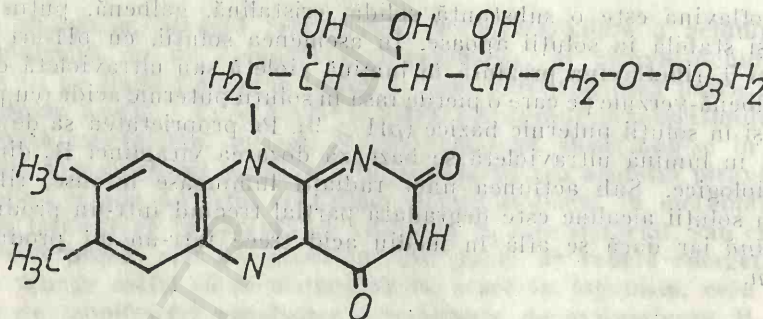


Fig. III.5 — Flavin-mononucleotidul.

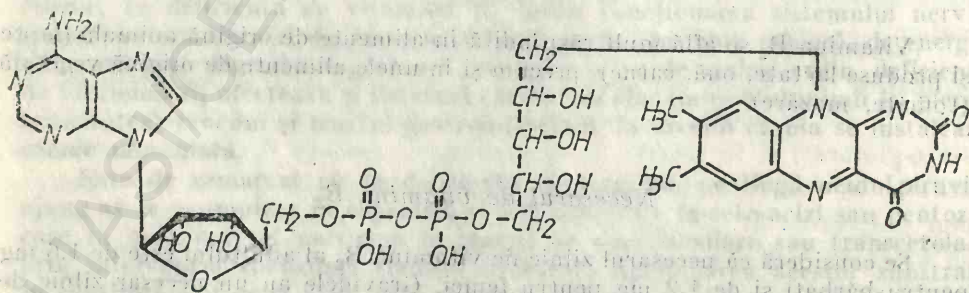


Fig. III.6 — Flavin-adenin-dinucleotidul.



## Coenzimele flavinice

Ambele flavin-nucleotide (FMN și FAD) sînt *coenzime* care fac parte din sisteme enzimatice implicate în diverse procese de oxido-reducere din organism. Datorită structurii coenzimelor respective, aceste enzime se mai numesc *flavoenzime* sau *flavoproteine*. În structura lor se remarcă o legătură strînsă (necovalentă) între coenzimă și partea proteică. De asemenea, majoritatea flavoproteinelor conțin metale cu rol de co-factori adiționali, de aceea enzimele respective sînt cunoscute și sub numele de *metalo flavoproteine*.

În reacțiile de oxido-reducere catalizate de flavoproteinele active, participanțele directe la procesele redox sînt tocmai coenzimele constitutive, FMN sau FAD. Într-adevăr, ciclul lor izoaloxazinic poate suferi reduceri reversibile prin fixarea, temporară, la atomii de azot din pozițiile 1 și 10 a doi atomi de hidrogen preluați de la substratele ( $\text{SH}_2$ ) cu care intră în reacție și care se oxidează ( $\text{S}_{\text{ox}}$ ):

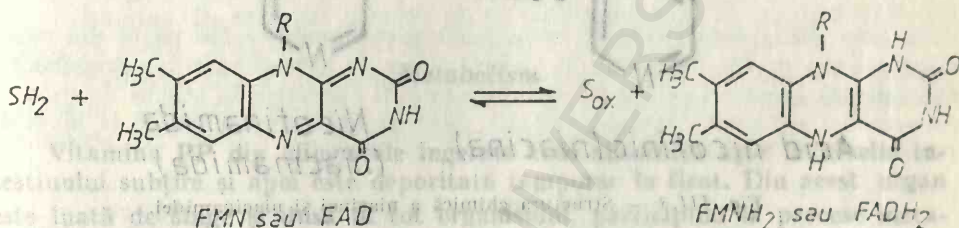


Fig. III.7 — Reducerea nucleului izoaloxazinic în flavin-nucleotide.

În acest fel, FMN sau FAD trec din formele lor oxidate în formele reduse  $\text{FMNH}_2$  sau  $\text{FADH}_2$ .

Ca în orice reacție de oxido-reducere (de hidrogenare-dehidrogenare) și în reacția de mai sus participă două sisteme redox:  $\text{SH}_2/\text{S}_{\text{ox}}$  și  $\text{FMN}/\text{FMNH}_2$  (sau  $\text{FAD}/\text{FADH}_2$ ). După cum se știe, fiecare sistem redox se caracterizează printr-un potențial electric standard. Valorile acestor potențiale pentru sistemele  $\text{FMN}/\text{FMNH}_2$  și  $\text{FAD}/\text{FADH}_2$  servesc la precizarea locului lor de intervenție în lanțul transportorilor de hidrogen și electroni (vezi capitolul referitor la „Metabolismul energetic“).

În studiul metabolismelor se vor întîlni numeroase reacții de oxido-reducere (dehidrogenare-hidrogenare) catalizate de enzime care admit drept coenzime FMN sau FAD. Se înțelege, în aceste condiții, cât de important este rolul metabolic al coenzimelor flavinice și implicit, al vitaminei  $\text{B}_2$  constitutive.

### III.3.1.3. Vitamina PP (niacina) și coenzimele nicotinamidice

Vitamina PP este vitamina antipelagroză (*pellagra preventiv factor* = factor de prevenire a pelagrei). Din punct de vedere chimic, vitamina PP sau *niacina* este, de fapt, *acidul nicotinic* (vezi formula). La rîndul său, acidul nicotinic poartă acest nume deoarece intră în constituția alcaloidului toxic

nicotina din tutun. Este de remarcă că acidul nicotinic reprezintă componentul netoxic din structura nicotinei. Aceeași acțiune vitaminică antipela-groasă o are și amida acidului nicotinic, *nicotinamida* sau *niacinamida* (vezi formula). Prin urmare, ambele substanțe (niacina și nicotinamida) sînt vita-merele vitaminei PP.

### Constituția chimică și proprietăți

Acidul nicotinic este o substanță solidă, cristalină, incoloră, solubilă în apă și foarte solubilă în soluții alcaline. Nicotinamida este o substanță solidă, incoloră, cristalină, solubilă în apă.

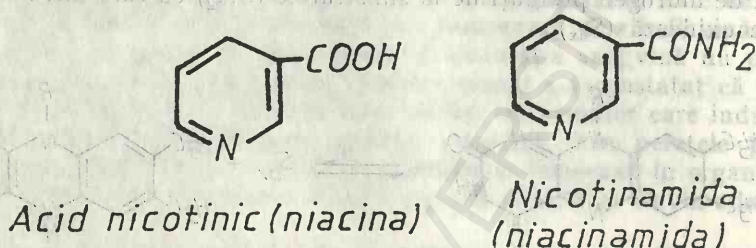


Fig. III.8 — Structura chimică a niacinei și niacinamidei.

### Răspindire

Alimentele relativ bogate în vitamina PP sînt : carnea (în special ficatul), făina integrală, drojdia de bere, laptele și unele legume : fasole (soia), mazăre verde, spanac, cartofi.

### Necesarul de niacină

Acest necesar de vitamină PP este considerat în funcție de aportul caloric. În general, se admite că o cantitate de 6,6 mg niacină corespunde la 1 000 cal. Această a condus la următoarele cantități recomandate ca necesar zilnic : 18 mg pentru bărbați, 13 mg pentru femei și 9—16 mg pentru copii. În perioadele de creștere, după exerciții fizice, în perioadele de sarcină și alăptare nevoile de vitamină PP sînt crescute. Trebuie remarcat faptul că necesarul de niacină al omului (și al multor animale) poate fi împlinit, în parte, pe seama triptofanului din rația alimentară. Într-adevăr, așa cum se arată la metabolismul acestui aminoacid, triptofanul conduce, prin degradarea sa, la formarea de acid nicotinic. Ținînd seama și de această proveniență, se admite că necesarul de acid nicotinic al adultului poate ajunge pînă la 25 mg/zi. În rația normală, completă, se asigură și aportul util de triptofan. Cînd se consumă însă, în mod prelungit și în cantități apreciabile, alimente cu conținut redus de triptofan (ex. : mămăliga) se creează deficiențe de niacină datorită faptului că bobul de porumb este foarte sărac în triptofan.



**Carența** vitaminei PP determină pelagra, numită și „maladia celor trei D”: dermatită, diaree, demență. Primul semn al pelagrei este dermatita (manifestată prin eriteme, descuamații, ulceratii) provocată de expunerea la soare. După cum se știe, această expunere nu cauzează nici un fel de tulburări majore (de tip dermatită) la persoanele hrănite normal. Al doilea simptom al pelagrei îl constituie tulburările digestive care conduc la diaree (eventual cronică). Al treilea simptom, demența, corespunde unei culminări a tulburărilor nervoase și psihice, întâlnite la persoane ajunse în stadiul de cronicizare a bolii. Trebuie însă subliniat faptul că administrarea vitaminei PP, în special în fazele neajunse la cronicizare, poate înlătura simptomele bolii foarte repede (dermatita și diareea dispar în 2—3 zile de tratament). Cu doze mai mari de vitamină PP se pot îndepărta complet și manifestările de delir.

Administrarea cantităților mai mari (până la 100 mg/zi) de niacină nu determină efecte de toxicitate. Cantitățile excesive provoacă însă prurit, roșirea pielii și, în general, modificări circulatorii deoarece vitamina PP determină dilatarea lumenului vaselor sangvine.

### Metabolism

Vitamina PP din alimentele ingerate este absorbită ușor la nivelul intestinului subțire și apoi este depozitată temporar în ficat. Din acest organ este luată de sânge și dusă în tot organismul, participând la procese metabolice importante. Excesul de vitamină PP este eliminat prin urină sub forma unor cataboliți ai nicotinamidei. Dintre aceștia, cel mai important este N-metil-nicotinamida.

Principalul rol metabolic al vitaminei PP în organism reiese din faptul că ea intră în structura a două *coenzime nicotinamidice* care participă la procese de oxido-reducere. Aceste coenzime sînt nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) și nicotinamid-adenin-dinucleotid-fosfat (NADP):

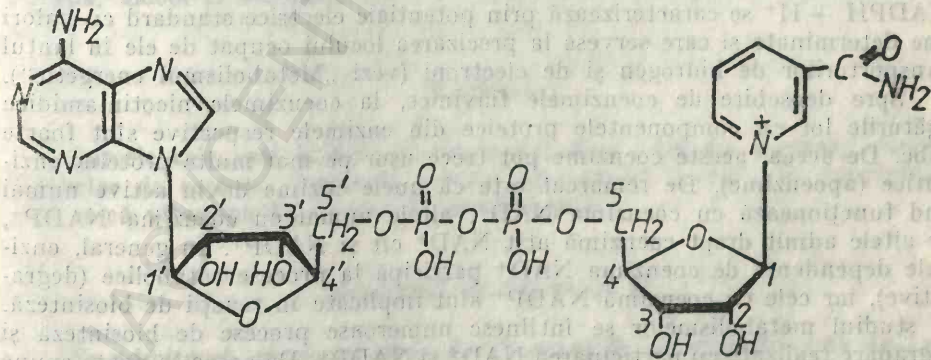


Fig. III.9 — Nicotinamid-adenin-dinucleotidul.

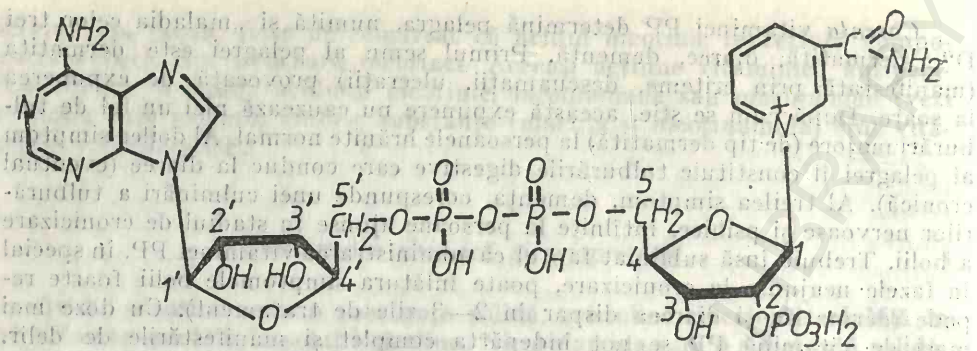


Fig. III.10 — Nicotinamid-adenin-dinucleotid-fosfat.

### Coenzimele nicotinamidice

Ca și coenzimele flavinice, coenzimele nicotinamidice fac parte din constituția unor enzime implicate în reacții redox de hidrogenare-dehidrogenare. Capacitatea acestor nucleotide piridinice de a fi coenzime în reacții de oxido-reducere se datorează însuși nucleului piridinic pe care-l conțin și la nivelul căruia are loc fixarea hidrogenului de la substrat:

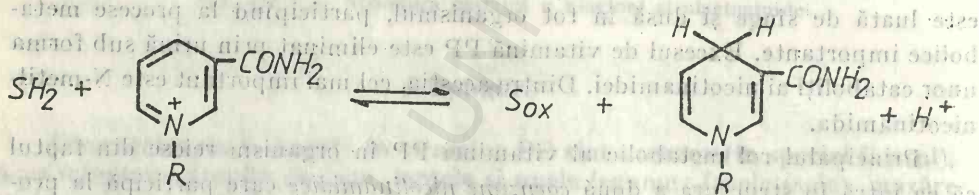


Fig. III.11 — Reducerea nucleului piridinic în coenzimele nicotinamidice.

Și în cazul coenzimelor nicotinamidice, sistemele lor redox participante la reacțiile de hidrogenare-dehidrogenare,  $\text{NAD}^+/\text{NADH} + \text{H}^+$  și  $\text{NADP}^+/\text{NADPH} + \text{H}^+$  se caracterizează prin potențiale electrice standard cu valori bine determinate și care servesc la precizarea locului ocupat de ele în lanțul transportorilor de hidrogen și de electroni (vezi „Metabolismul energetic”).

Spre deosebire de coenzimele flavinice, la coenzimele nicotinamidice legăturile lor cu componentele proteice din enzimele respective sînt foarte slabe. De aceea, aceste coenzime pot trece ușor pe mai multe proteine-enzimatică (apoenzime). De remarcat este că unele enzime devin active numai cînd funcționează cu coenzima  $\text{NAD}^+$ , altele numai cu coenzima  $\text{NADP}^+$ , iar altele admit drept coenzimă atât  $\text{NAD}^+$  cît și  $\text{NADP}^+$ . În general, enzimele dependente de coenzima  $\text{NAD}^+$  participă la procese catabolice (degradative), iar cele cu coenzimă  $\text{NADP}^+$  sînt implicate în reacții de biosinteză. În studiul metabolismelor se întîlnesc numeroase procese de biosinteză și degradare realizate cu participarea  $\text{NAD}^+$  și  $\text{NADP}^+$ . De aceea se poate spune că ambele coenzime nicotinamidice și vitamina PP constituentă sînt compuși de mare interes biochimic.



### III.3.1.4. Vitamina B<sub>6</sub> (piridoxina) și coenzimele derivate

Această vitamină din complexul B poartă indicele 6 pentru că în perioada în care se izolau diverși componenți ai complexului B s-a presupus că există și factorii B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub> și B<sub>5</sub>. Ulterior, s-a constatat însă că acești factori nu erau substanțe distincte, dar pentru că între timp fusese descoperită substanța cu acțiune vitaminică căreia i se dăduse numele de vitamina B<sub>6</sub>, denumirea ei s-a păstrat încă, alături de alte două denumiri: *piridoxina* și *adermina*.

Numele de „piridoxină” corespunde constituției sale chimice căci este un alcool cu nucleu piridinic (vezi formula). Denumirea de „adermină” este în legătură cu rolul său de a vindeca o dermatită specifică a șobolanului.

#### Constituție chimică și proprietăți

Vitamina B<sub>6</sub> este un derivat al piridinei, substituită în patru poziții: la C<sub>2</sub> cu metil, la C<sub>3</sub> cu oxidril iar la C<sub>4</sub> și C<sub>5</sub> cu câte un grup hidroximetil.

Piridoxina aflată în produsele vegetale sau animale este însoțită de două vitamine, înrudite structural: *piridoxalul* și *piridoxamina*, respectiv *aldehida* și *amina* (în poziția 4) corespunzătoare piridoxinei:

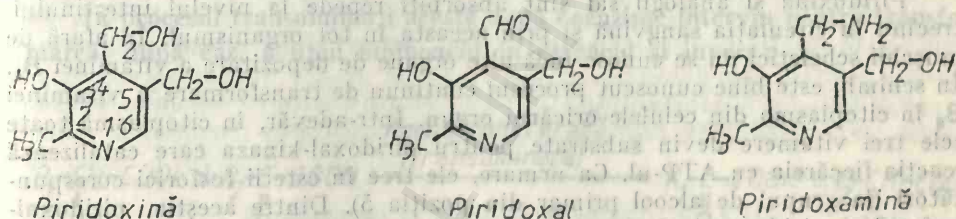


Fig. III.12—Structurile chimice ale celor trei compuși piridinici cu activitate de vitamină B<sub>6</sub>.

Piridoxina este o substanță solidă, cristalină, incoloră, ușor solubilă în apă, alcool și acetonă.

#### Răspîndire

Sursele cele mai bogate în piridoxină sînt: drojdia de bere, cortexul boabelor de cereale, legumele, carnea (în special ficatul). În concentrație mai mică vitamina B<sub>6</sub> se află în lapte și ouă.

#### Necesarul de vitamină B<sub>6</sub>

Se admite că necesarul zilnic de vitamină B<sub>6</sub> al adultului este de 2 mg. La copii acest necesar este mai redus: 0,6—1,2 mg. În stări fiziologice speciale (sarcină, alăptare, expunere la radiații, vîrstă înaintată, modificări

cardiace) nevoia de vitamină B<sub>6</sub> este crescută. Trebuie remarcat însă că aportul excesiv sau administrarea dozelor mărite de vitamină B<sub>6</sub> pot determina stări de toxicitate resimțite, în special, de sistemul nervos.

**Carența.** Când, din diverse cauze fiziologice, nevoia de vitamină B<sub>6</sub> nu este împlinită, apar simptomele caracteristice deficienței, îmbrăcând aspecte foarte variate: rețineri de apă în organism (mai cu seamă în timpul sarcinii), scăderea nivelului glucozei sangvine, nervozitate, dureri la nivelul membrilor, dermatite, căderea părului, tulburări de vedere, artrite, modificări cardiace. Tot pe seama deficienței de vitamină B<sub>6</sub> pot fi puse și anumite tipuri de anemie.

Este de remarcat faptul că deficiența exclusivă de piridoxină se întâlnește rar. Totuși, în cazul unor tratamente cu izoniazidă, medicament anti-tuberculos, această deficiență apare sistematic deoarece medicamentul se combină cu piridoxalul formând o hidrazonă solubilă, excretată rapid prin urină.

La șobolan, dermatita caracteristică apărută în carență de vitamină B<sub>6</sub> se numește acrodermie (în grecește, *akros* = vîrf) deoarece ea se caracterizează prin inflamația și descuamarea pielii extremităților (labe, bot, urechi, pleoape).

### Metabolism

Piridoxina și analogii săi sînt absorbiți repede la nivelul intestinului trecînd în circulația sangvină și prin aceasta în tot organismul. În afară de mușchii scheletici nu se cunosc încă alte organe de depozitare a vitaminei B<sub>6</sub>. În schimb, este bine cunoscut procesul continuu de transformare a vitaminei B<sub>6</sub> în citoplasma din celulele oricărui organ. Într-adevăr, în citoplasmă toate cele trei vitamine devin substrate pentru piridoxal-kinaza care catalizează reacția fiecăreia cu ATP-ul. Ca urmare, ele trec în esteri fosforici corespunzători (la grupul de alcool primar din poziția 5). Dintre aceștia, piridoxal-fosfatul și piridoxamin-fosfatul sînt *coenzime* participante la diverse reacții metabolice, în special, ale aminoacizilor: transaminare, decarboxilare, trans-sulfurare.

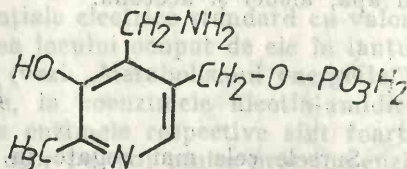
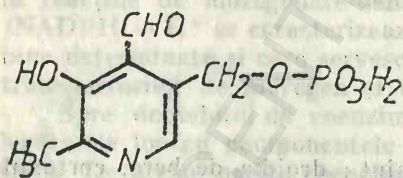


Fig. 111.13 — Piridoxalfosfatul și piridoxaminofosfatul.

În cazuri de insuficiență renală, piridoxal-kinaza este inhibată astfel încît, deși aportul de vitamină B<sub>6</sub> poate fi normal, nu are loc concomitent formarea de piridoxalfosfat; astfel se instalează deficiența de coenzimă. În organism, vitamina B<sub>6</sub> (oricare vitamină, ca atare sau sub formă de ester-fosforic) participă și la alte procese importante: producerea de anticorpi, formarea eritrocitelor, absorbția vitaminei B<sub>12</sub>, sinteza acizilor nucleici,



menținerea echilibrului ionic al sodiului și potasiului, funcționarea normală a sistemului nervos și a celui muscular, degradarea triptofanului până la stadiu de vitamină PP. Datorită acestei ultime intervenții, deficiența de piridoxină este asociată adesea cu pelagra.

Ca și în cazul vitaminei PP, eliminarea vitaminei B<sub>6</sub> se face pe cale renală sub forma unui catabolit al său. Acesta este acidul 4-piridoxic. El reprezintă mai mult de 90% din compușii B<sub>6</sub> excretați prin urină. În cantitate foarte mică se excretă și piridoxalul, ca alare. Piridoxal-fosfatul din sînge fiind strîns legat de albumină nu poate suferi filtrare glomerulară; deci el nu se excretă prin urină. Determinarea fluorimetrică a acidului 4-piridoxic în urină servește la aprecierea stării de saturație a organismului în vitamină B<sub>6</sub>. Într-adevăr, excreția vitaminei B<sub>6</sub> — ea și a oricărei vitamine — depinde cantitativ de nevoia relativă a țesuturilor; ceea ce înseamnă că organismele carentate rețin mai mult din vitamina respectivă și deci excretă mai puțin decît cele normale (necarentate).

### Coenzimele piridoxalfosfat și piridoxaminfosfat

În procesul transaminării aceste două coenzime intervin pentru transformarea, după caz, a unui aminoacid în cetoacid și invers:

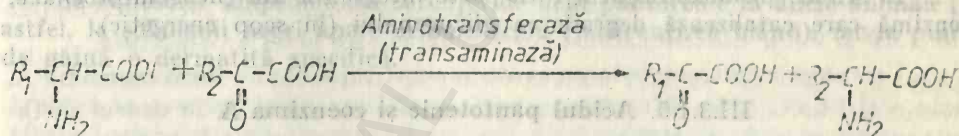


Fig. III.14 — Reacția generală de transaminare.

Mecanismul (de ping-pong) al reacției de transaminare poate fi urmărit ușor dacă se iau în considerație notațiile:

E-CHO = aminotransferaza cu coenzimă piridoxalfosfat

E-CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> = aminotransferaza (aceeași) cu coenzimă piridoxaminfosfat și dacă se ține seama de intervenția succesivă a celor două coenzime în reacții reversibile:

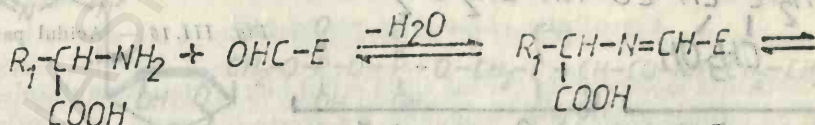
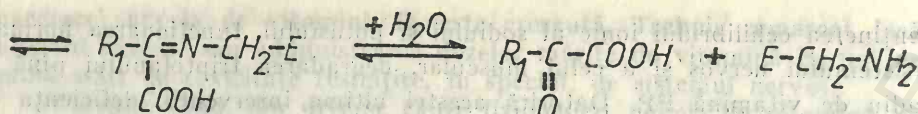
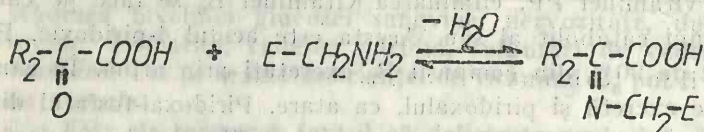


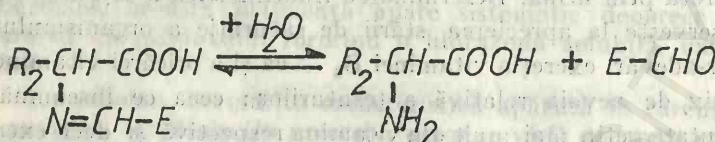
Fig. III.15 — Mecanismul transaminării.



Baza Schiff II



Baza Schiff III



Baza Schiff IV

Fig. III.15 — Mecanismul transaminării.

Piridoxalfosfatul joacă rol de coenzimă în reacțiile de decarboxilare a aminoacizilor, tot prin formare de baze Schiff intermediare.

Coenzima piridoxalfosfat participă și la procesul de transulfurare, de exemplu, la reacția metioninei cu serina din care rezultă cisteina (vezi metabolismul acestor aminoacizi).

În sfârșit, piridoxalfosfatul face parte integrantă din glicogenfosforilaza, enzimă care catalizează degradarea glicogenului (în scop energetic).

### III.3.1.5. Acidul pantotenic și coenzima A

Acidul pantotenic poartă acest nume (în grecește, *pan* = tot, peste tot) pentru că este foarte mult răspândit în țesuturile vegetale și animale. El este vitamină pentru om dar și factor de creștere pentru microorganisme.

#### Constituție chimică și proprietăți

Din punct de vedere structural, acidul pantotenic este produsul condensării acidului 2,4-dihidroxi-3,3'-dimetil-butiric (numit și acid pantoic) cu  $\beta$ -alanina:

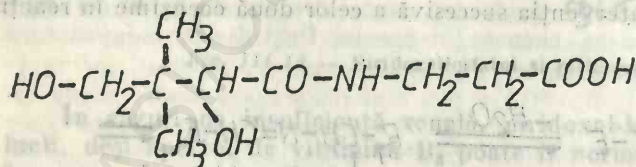


Fig. III.16 — Acidul pantotenic.

Acid pantoic       $\beta$ -alanină

Acidul pantotenic este un ulei galben-viscos, solubil în apă.



## Răspîndire

Cele mai bogate surse de acid pantotenic sînt : drojdia de bere, boabele cerealelor, gălbenușul de ou, carnea (organe). În organism acidul pantotenic provine și prin sintetizarea sa de către flora bacteriană intestinală.

## Necesarul de acid pantotenic

Necesarul zilnic de acid pantotenic este considerat, după unii autori, de 5 mg pentru adult și 10 mg pentru copii. După alți cercetători necesarul mediu ar fi cuprins între 10 și 15 mg, iar cel optim 30—50 mg/zi. În situațiile de stres prelungit nevoia de acid pantotenic este apreciabil crescută.

**Carența.** Pentru motivele arătate anterior (răspîndire largă în alimente și sintetizare permanentă de către flora intestinală) deficiența de acid pantotenic se întâlnește rareori. Cînd, din diverse cauze, această deficiență totuși apare, simptomele carenței sînt multiple și variate : vîrsături, dureri abdominale, crampe musculare, infecții ale căilor superioare respiratorii, sensibilizarea organismului la alte infecții (datorită, probabil, scăderii capacității de formare a anticorpilor). De asemenea, deficiența de acid pantotenic conduce la modificări cutanate și scăderea funcțiilor suprarenaliene. Datorită acestui ultim efect se pot produce și alte tulburări : hipoglicemie, reducerea capacității fizice, disfuncții ale nervilor motori, depresii mentale. Unele cercetări au dovedit o strînsă dependență între nivelul acidului pantotenic și predispoziția la artrite reumatismale, simptomele bolii accentuîndu-se în cazul concentrațiilor reduse de acid pantotenic în organism.

Se cunosc și simptome ale carenței de acid pantotenic la unele animale ; astfel, la șobolanii negri apare *acromelichia* (încălunțirea blănii), iar la puii de găină o dermatită specifică.

## Metabolism

Acidul pantotenic din hrana ingerată este absorbit ușor la nivelul intestinului și trecînd în sînge este dus la toate organele unde este fosforilat pe seama ATP-ului, sub acțiunea unei kinaze specifice. Produsul rezultat este antrenat ulterior într-o serie de alte patru reacții enzimatice, succesive, conducînd la formarea coenzimei A :

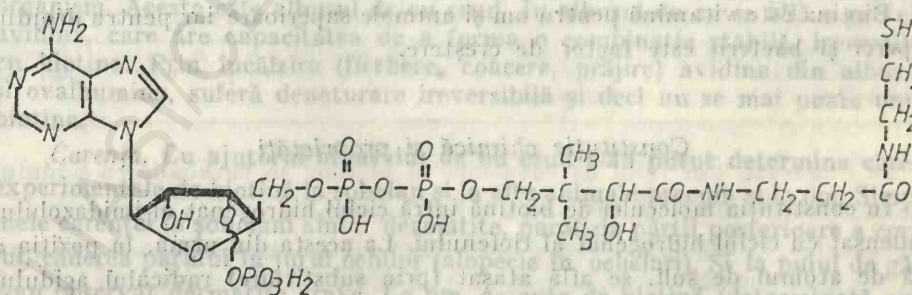


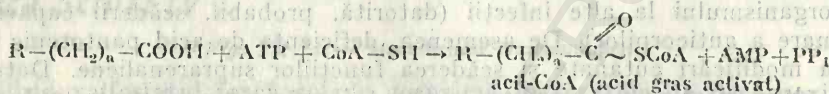
Fig. III.17 — Coenzima A.

Cercetări relativ recente (1986) au dovedit însă că în creier acidul pantotenic, ca atare, își păstrează concentrația constantă, deoarece la nivelul acestui organ el nu este metabolizat fiind inhibată kinaza specifică ce catalizează reacția sa cu ATP-ul, prima din calea de formare a coenzimei A.

Excreția acidului pantotenic, nemodificat, se face prin urină.

### Coenzima A

Coenzima A participă la numeroase procese biochimice fundamentale, atât de biosinteză (spre exemplu biosinteza acizilor grași, a colesterolului), cât și de degradare (în special, la degradarea oxidativă a catenelor hidrocarbonate din diverși cataboliți). Posibilitatea coenzimei A de a participa la reacții numeroase și variate se datorează faptului că gruparea  $-SH$  din molecula sa poate forma legături tiolesterice, macroergice. Spre exemplu, „activarea” acizilor grași (premergătoare degradării oxidative sau biosintezei lor) are loc conform reacției :



Se observă că în reacție s-a preesentat structura coenzimei A libere sub forma  $CoA-SH$  pentru a se pune în evidență grupul reactiv  $-SH$ . Acesta este modul obișnuit de a se nota forma liberă a coenzimei A. De asemenea, din reacție se observă că legătura macroergică,  $C \sim S$  (din tiolesterul acidului gras) s-a format prin desfacerea unei legături macroergice din ATP (descompus în AMP și  $PP_i$ ). Enzima catalizantă a reacției este acil-CoA-sintetaza.

Un compus macroergie important, în constituția căruia intră coenzima A, este acetil-CoA,  $CH_3-CO \sim SCoA$ , întâlnit deseori, mai ales în cadrul metabolismului glucidic și lipidic.

### III.3.1.6. Biotina și rolul ei coenzimatic

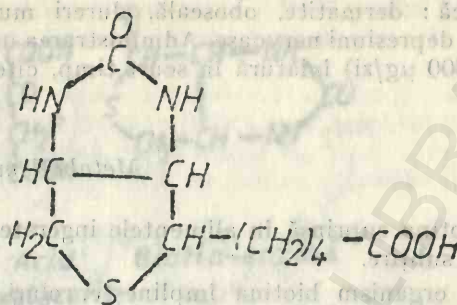
Biotina este vitamină pentru om și animale superioare iar pentru drojdii, ciuperci și bacterii este factor de creștere.

#### Constituție chimică și proprietăți

În constituția moleculei de biotină intră ciclul hidrogenat al imidazolului condensat cu ciclul hidrogenat al tiofenului. La acesta din urmă, în poziția  $\alpha$  față de atomul de sulf, se află atașat (prin substituție) radicalul acidului valerianic :



Fig. 111.18. — Biotina.



Biotina este o substanță solidă, cristalină, incoloră, solubilă în apă. Spre deosebire de alte vitamine hidrosolubile, biotina este stabilă la încălzire, însă acizii și bazele o descompun.

### Răspîndire

Biotina este mult răspîndită în natură; probabil se află în cantități foarte mici în toate celulele vii, animale și vegetale. Sursele cele mai bogate de biotină sînt: ficatul, gălbenușul de ou, laptele, tomatele, drojdia de bere, orezul (nedecorticat).

### Necesarul de biotină

Se apreciază că necesarul zilnic de biotină este de 150—300  $\mu\text{g}$ , fiind crescut în perioadele de sarcină și alăptare. Pînă în prezent, nu se cunosc efecte toxice datorate unor cantități mai mari de biotină. Este de remarcă că pentru împlinirea nevoilor de biotină organismul omului nu depinde imperios de sursele dietare deoarece vitamina este sintetizată de bacteriile intestinale. Într-adevăr, studii minuțioase de bilanț alimentar au dovedit că, la om, excreția urinară de biotină întrece, de cele mai multe ori, aportul dietar iar excreția fecală este de 3—6 ori mai mare decît acest aport. Prin urmare, bacteriile intestinale contribuie substanțial la mărirea aportului de biotină. Există însă un factor alimentar care poate face biotina inefficientă pentru organism. Acesta este albușul de ou crud. În albușul de ou se află o proteină, avidina, care are capacitatea de a forma o combinație stabilă, ireversibilă, cu biotina. Prin încălzire (fierbere, coacere, prăjire) avidina din albuș, ca și ovalbumina, suferă denaturare ireversibilă și deci nu se mai poate uni cu biotina.

**Carența.** Cu ajutorul albușului de ou crud s-au putut determina carențe experimentale de biotină la șobolan și la alte animale precum și la om. Simptomele carenței la șobolani sînt: dermatite, paralizia părții posterioare a corpului, căderea părului în jurul ochilor (alopecie în ochelari). Și la puiul de găină s-au observat dermatite grave. La om, carența de biotină (determinată experimental prin hrănire cîteva săptămîni cu rații cuprinzînd albuș de ou crud)

provoacă : dermatite, oboseală, dureri musculare, scăderea apetitului, insomnii, depresiuni nervoase. Administrarea unor cantități foarte mici de biotină (150—300  $\mu\text{g}/\text{zi}$ ) înlătură în scurt timp, câteva zile, aceste simptome.

### Metabolism

Biotina cuprinsă în alimentele ingerate este absorbită la nivelul intestinului subțire.

În organism biotina împlinește roluri importante, participând în mod constant la metabolismul lipidelor, formarea și degradarea oxidativă a acizilor grași, precum și la metabolismul glucidelor, carboxilarea acidului piruvic pentru formarea acidului oxalacetic (component în ciclul acidului citric). De asemenea, biotina intervine și în alte reacții importante care necesită fixarea dioxidului de carbon pe unii metaboliți. În toate aceste reacții biotina funcționează cu rol de coenzimă.

### Rolul de coenzimă al biotinei

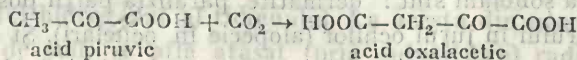
În calitate de coenzimă a carboxilazelor, biotina ia parte la reacții de carboxilare care aparțin unor căi metabolice bine precizate.

Tabel III.1

Enzime care funcționează cu coenzima biotină

Enzima	Rolul metabolic
Piruvat-carboxilaza	Prima reacție pe calea care transformă precursorii — formați din unități cu 3 atomi de carbon — în glucoză (gluconeogeneză). Procură oxalacetat pentru ciclul acidului citric
Acetil-CoA-carboxilaza	Procură unități cu 2 atomi de carbon în sinteza acizilor grași prin formare de malonil-CoA
Propionil-CoA-carboxilaza	Transformă propionatul în succinat care intră apoi în ciclul acidului citric
$\beta$ -metil-crotonil-CoA-carboxilaza	Intervine în catabolismul leucinei și al unor compuși izoprenoidici

Se ilustrează aici rolul de coenzimă al biotinei în carboxilarea acidului piruvic. Reacția generală este :



dar  $\text{CO}_2$  participă numai sub forma activată, adică legat cu biotina :





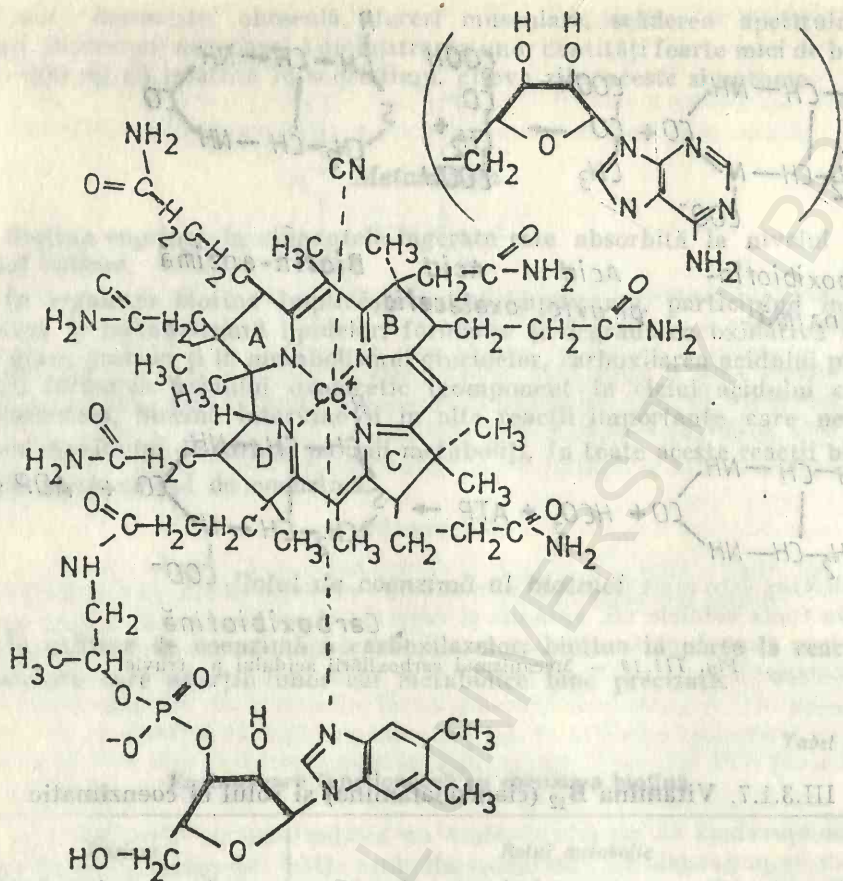


Fig. III.20 — Structura vitaminei B<sub>12</sub>.

În paranteză este restul adenzil care înlocuiește gruparea CN din coenzimă.

După cum se poate observa din formulă, în structura vitaminei B<sub>12</sub> se disting două părți: una „centrală”, a nucleului corinic (asemănătoare nucleului tetrapirolic al hemului din hemoglobină) și o parte „externă” similară unui nucleotid cu riboză.

Nucleul corinic din partea centrală diferă de cel al hemului (vezi formula acestuia la hemoglobină) prin următoarele elemente:

- în centru se află ionul Co,
- sistemul tetrapirolic este mai saturat,
- două din nucleele pirolice sînt unite direct între ele,
- are un număr mai mare de substituenți, majoritatea lor cu grupări amidice.

Nucleotidul cu riboză din partea externă este 5,6-dimetilbenzimidazolul. El este unit prin două legături cu regiunea centrală: una din legături este directă între unul din atomi de azot ai benzimidazolului și ionul monovalent



de cobalt, iar a doua legătură se realizează prin intermediul restului de acid fosforic al nucleotidului cu riboză și o catenă atașată la unul din cele patru nuclee piractice. Ciancobalamina este o substanță solidă, cristalizată sub formă de ace roșii-rubinii, stabilă până la temperaturi ridicate. (300°), ușor solubilă în apă. Ciancobalamina este forma cea mai stabilă de vitamină B<sub>12</sub> și de aceea este preferată pentru produsele comerciale respective (se obține din bacterii prin fermentație).

### Răspindire

Vitamina B<sub>12</sub> se găsește în carne (ficat, rinichi, mușchi, pește) și în produse lactate.

### Necesarul de vitamină B<sub>12</sub>

Necesarul zilnic, minim dar esențial, de vitamină B<sub>12</sub> este de 3 μg pentru adulți și copii mici iar pentru copii mai mari, de 1 μg. În cazuri fiziologice particulare (de sarcină sau alăptare), necesarul de vitamină B<sub>12</sub> este crescut (4 μg/zi). Trebuie remarcat faptul că această vitamină reprezintă una din cele mai active substanțe cunoscute. Într-adevăr, s-a constatat că administrarea de numai 1 μg vitamină B<sub>12</sub> unui bolnav de anemie pernicioasă duce la activarea imediată și puternică a hematopoezei.

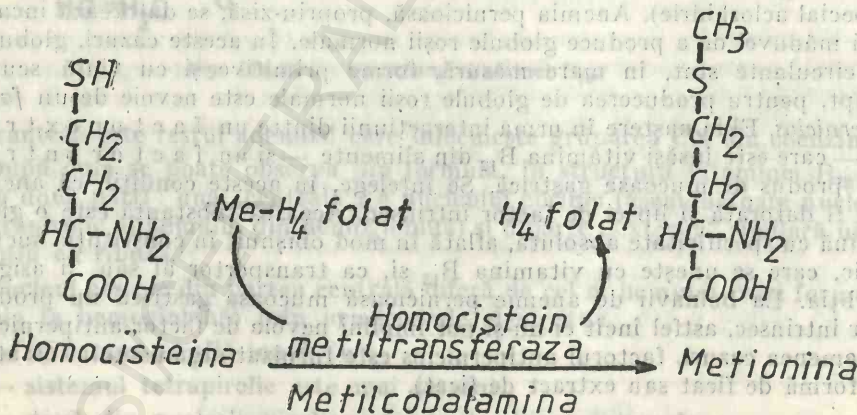
**Carența.** Vitamina B<sub>12</sub> este considerată drept factorul antipernicios, căci lipsa ei din organism determină anemia pernicioasă, numită și boala lui Biermer. Această maladie este o anemie macrocitară, hiperromă, însoțită de: leucopenie, tulburări nervoase (scăderea răspunsurilor reflexe și a percepției sensoriale, greutate de vorbire și mers) și tulburări interesind tractul digestiv (în special aclorhidrie). Anemia pernicioasă, propriu-zisă, se datorează incapacității măduvei de a produce globule roșii normale. În aceste cazuri, globulele roșii circulante sînt, în mare măsură, forme primitive și cu viață scurtă. De fapt, pentru producerea de globule roșii normale este nevoie de un factor *antipernicios*. El ia naștere în urma interacțiunii dintre un factor *extrinsec* — care este însăși vitamina B<sub>12</sub> din alimente — și un factor *intrinsec*, produs de mucoasa gastrică. Se înțelege, în aceste condiții, că anemia poate fi datorată și lipsei de factor intrinsec. Această substanță este o glicoproteină cu specificitate absolută, aflată în mod obișnuit în constituția sucului gastric, care se unește cu vitamina B<sub>12</sub> și, ca transportor al său, îi asigură absorbția. La bolnavii de anemie pernicioasă mucoasa gastrică nu produce factor intrinsec, astfel încît ei nu-și pot împlini nevoia de factor antipernicios. În asemenea cazuri, factorul antipernicios este furnizat organismului ca atare (sub formă de ficat sau extract de ficat).

### Metabolism

Vitamina B<sub>12</sub> din alimente, eliberată în intestin, se unește cu factorul intrinsec secretat de celulele mucoasei gastrice și sub această formă, este absorbită. Ulterior, factorul intrinsec se detașează și vitamina B<sub>12</sub> este preluată

## Rolul coenzimatic al vitaminei B<sub>12</sub>

1) Metilarea homocisteinei, pentru transformarea acesteia în metionină, are loc în citoplasmă utilizându-se  $N_5$ -metil-tetrahidrolat (Me- $H_4$ -folat) ca donor de metil. Enzima catalizată este homocistein-metil-transferaza care admite, drept coenzimă specifică, metilcobalamina.

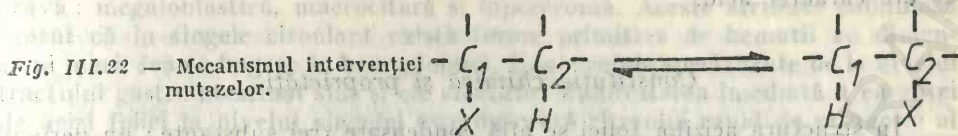


*Fig. III.21 — Rolul coenzimatic al metilcobalaminei.*

110



2) Izomerizarea catalizată de mutaze are loc conform reacției:



În cazul L-metil-malonil-CoA izomerizarea la succinil-CoA decurge conform reacției:

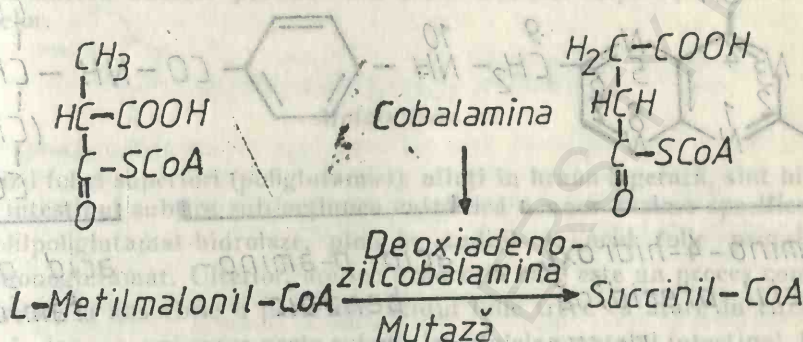


Fig. III.23 — Rolul coenzimatic al desoxiadeno-zilcobalaminei.

fiind catalizată de enzima L-metil-malonil-CoA-mutaza, care funcționează cu coenzima sa specifică, desoxiadeno-zilcobalamina.

Este de remarcă că deficiența de vitamină B<sub>12</sub> (datorată fie malabsorbției sale intestinale, fie incapacității transcobalaminei de a o elibera țesuturilor) se poate resimți pînă la nivelul acestor reacții. Astfel, în primul caz, homocisteina rămîne nemetilată și ajunge să se elimine prin urină (homocistinurie), iar în al doilea caz, pentru motive de aceeași natură, acidul L-metil-malonic se elimină tot prin urină (acidurie metilmalonice).

Există și patru tulburări metabolice ereditare caracterizate prin incapacitatea organismului de a folosi vitamina B<sub>12</sub> cu rol de coenzimă în reacții de felul celor ilustrate mai sus. În două din aceste maladii ereditare este afectată numai formarea (sinteza) desoxiadeno-zilcobalaminei, iar în celelalte două s-a pus în evidență incapacitatea de formare fie a desoxiadeno-zilcobalaminei, fie a metil-cobalaminei.

### III.3.1.8. Acidul folic și coenzimele derivate

Numele de acid folic este generic, el corespunzînd mai multor vitamine ale sale, înrudite prin structuri chimice și care au același rol de vitamină pentru organismele superioare. Ca și alte vitamine din complexul B, acidul folic este, totodată, factor de creștere pentru microorganisme. Denumirea „acid

folie" se datorează faptului, că prima substanță descoperită din acest grup de vitamine a fost izolată din frunze (în latinește „folia“) de spanac și s-a dovedit că are caracter acid.

### Constituție chimică și proprietăți

În structura acizilor folici se află condensate trei substanțe : un derivat trisubstituit al heterociclului numit pteridină, acidul p-aminobenzoic și acidul glutamic.

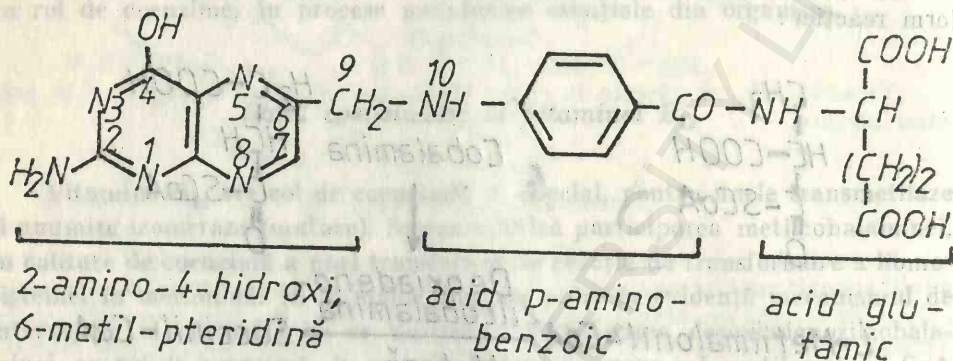


Fig. III.24 — Acidul folie (pteroilmonoglutamat).

Numele de pteroilmonoglutamat este în legătură cu structura chimică deoarece compusul rezultat din condensarea 2-amino-4-hidroxi-6-metil-pteridinei cu acidul p-aminobenzoic se numește *acid pterioic* și acesta este condensat, la rândul său, cu un singur rest de acid glutamic. Se cunosc însă alți doi acizi folici : pteroiltriglutamatul (cu trei resturi de acid glutamic) și pteroilheptaglutamatul (cu șapte resturi de acid glutamic). În acești acizi folici resturile de acid glutamic sînt condensate între ele, într-un mod special (neobișnuit). Într-adevăr, la fiecare condensare ia parte gruparea carboxil din poziția γ (g a m m a) a unui rest și gruparea amino a altui rest (următorul) de acid glutamic.

Acidul folie (pteroilmonoglutamatul) este o substanță solidă, cristalină, galbenă, puțin solubilă în apă, mai ușor solubilă în soluții alcoolice diluate.

### Răspîndire

Sursele cele mai bogate în acid folie sînt : drojdia, ficatul, rinichii, peștele vișegetalele verzi. Fructele conțin foarte puțini acizi folici.

### Necesarul de acizi folici

Se consideră că necesarul zilnic de acid folie este de 400 μg pentru adult. În situații fiziologice speciale necesarul este crescut ; în sarcină 800 μg iar în perioada de alăptare 600 μg. De asemenea, necesarul de acid folie este crescut în stări de stres și în anumite maladii.



**Carența.** La animalele superioare, carența în acizi folici îmbracă manifestări variate. Între cele mai caracteristice este însă un gen special de anemie gravă: megaloblastică, macrocitară și hipereromă. Aceste atribute subliniază faptul că în singele circulant există forme primitive de hematii cu dimensiuni mari, foarte bogate în hemoglobină. Unele celule specializate de la nivelul tractului gastrointestinal sînt și ele afectate. Manifestarea imediată a carenței de acizi folici la nivelul singelui este datorată ritmului rapid de reînnoire al celulelor sangvine, în special al eritrocitelor. De fapt, carența de acizi folici este resimțită de toate celulele deoarece unii dintre acești acizi (acizii tetrahidrofolici, notați prescurtat  $\text{FH}_4$  sau  $\text{THFA}$ ) participă, în calitate de coenzime, la sinteza bazelor purinice din acizii nucleici implicați în biosinteza proteinelor.

### Metabolism

Acizii folici superiori (poliglutamici), aflați în hrana ingerată, sînt hidrolizați în intestinul subțire sub acțiunea catalitică a unor enzime specifice, numite folilpoliglutamat-hidrolaze, pînă la stadiul de acid folic propriu-zis, pteroilmonoglutamat. Ulterior, are loc absorbția care este un proces complex. Într-adevăr, la absorbție o parte din acidul folic trece ca atare în circulația sanguină, dar cea mai mare parte suferă, în celulele peretelui intestinal, hidrogenare (reducere) trecînd în tetrahidrofolat,  $\text{H}_4$ -folat, și metilare cu formarea  $\text{N}^5$ -me- $\text{H}_4$ -folat (vezi formulele). În disfuncții intestinale provocate de diverse cauze și în steatoza idiopatică absorbția folatului decurge defectuos.

În plasmă, aproximativ 2/3 din folat se află unit cu o proteină. Aceasta este, bineînțeles, reținută la filtrarea glomerulară astfel încît prin urină se elimină numai acidul folic. Este de remarcat că unele produse rezultate din desfacerea moleculei de acid folic se elimină prin bilă.

Cel mai important rol pe care-l îndeplinește în organism acidul folic este acela de transportor al unor entități cuprinzînd cîte un atom de carbon și care sînt folosite în multiple biosinteze. Pentru a împlini această funcție, acidul folic este, în prealabil, hidrogenat la  $\text{H}_4$ -folat, sub acțiunea folat-reductazelor care utilizează ca donör de hidrogen  $\text{NADPH} + \text{H}^+$ . Reducerea are loc la nivelul dublelor legături 5—6 și 7—8 din nucleul pteridinic al acidului folic propriu-zis (pteroilmonoglutamat):

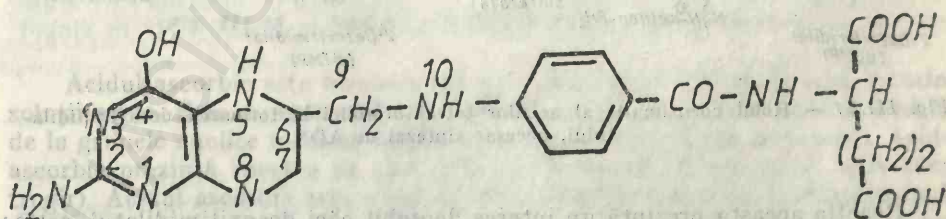


Fig. III.25 — Acidul tetrahidrofolic ( $\text{FH}_4$  sau  $\text{THFA}$ ).

## Rolul coenzimatic al acizilor tetrahidrofolic

În calitate lor de coenzime în procese enzimatice de transfer, acizii tetrahidrofolic participă la trecerea grupărilor cu un carbon: metil ( $-\text{CH}_3$ ), hidroximetil ( $-\text{CH}_2\text{OH}$ ), formil ( $-\text{CHO}$ ), formimino ( $-\text{CH}=\text{NH}$ ), de la un metabolit la altul. Spre exemplu, transferul grupului cu un carbon de pe serină pe homocisteină cu formare de metionină are loc conform reacțiilor din fig. III.26.

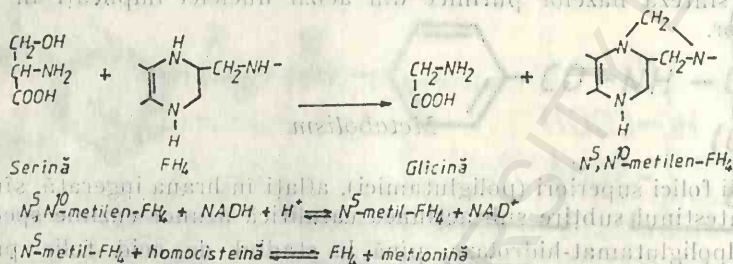


Fig. III.26 — Participarea acizilor tetrahidrofolic, cu rol coenzimatic, la formarea metioninei.

După cum s-a arătat la vitamina  $\text{B}_{12}$ , ultima reacție din fig. III.26 are loc și cu participarea coenzimatică a cobalaminei, pentru transferul grupului  $-\text{CH}_3$  (Fig. III.21).

$\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -metilen- $\text{H}_4\text{F}$ , participant în reacția precedentă, are rol coenzimatic și în cedarea unui grup metil desoxitimidilatului pentru a-l transforma în desoxitimidilat:

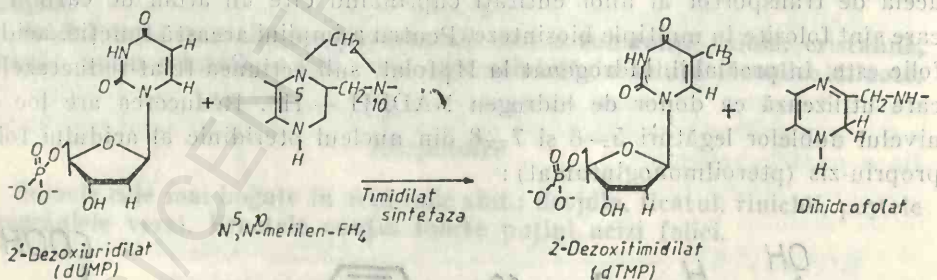


Fig. III.27 — Rolul coenzimatic al acizilor tetrahidrofolic la formarea desoxitimidilatului, necesar sintezei de ADN.

Reacția aceasta prezintă un interes deosebit căci desoxitimidilatul, astfel format, este precursor implicat în sinteza ADN-ului.



### III.3.2. VITAMINA C (ACIDUL ASCORBIC)

Vitamina C poartă și numele de acid ascorbic ( $a$  = fără, *scorbut* = rădăcina cuvintului scorbut) deoarece este o substanță acidă (acid organic) și vindecă boala numită scorbut. Această boală, determinată de lipsa vitaminei C, se întâlnește numai la om, unele maimuțe (primate), cobai și liliac, deoarece nu au capacitatea de a sintetiza acidul ascorbic în organismul lor. Alte animale și diverse plante îl sintetizează prin transformări enzimactice bine cunoscute ale hexozelor (glucoză, galactoză).

#### Constituție chimică și proprietăți

Structura moleculei de acid ascorbic este înrudită cu cea a hexozelor. De fapt, el poate fi considerat drept  $\gamma$ -lactona unui acid hexuronic, numit acid L-gulonic. În moleculă mai sînt cuprinse și patru grupări  $-OH$ : două alcoolice (la  $C_5$  și  $C_6$ ) și două enolice la ( $C_2$  și  $C_3$ ). Atomul de carbon  $C_5$  are configurație stîngă.

Prin îndepărtarea atomilor de hidrogen din grupul endiolic se obține acidul dehidroascorbic. Ambele forme (acid ascorbic, acid dehidroascorbic) devin interconvertibile prin hidrogenare-dehidrogenare și sînt fiziologic-active. Structurile lor sînt prezentate în fig. III.28.

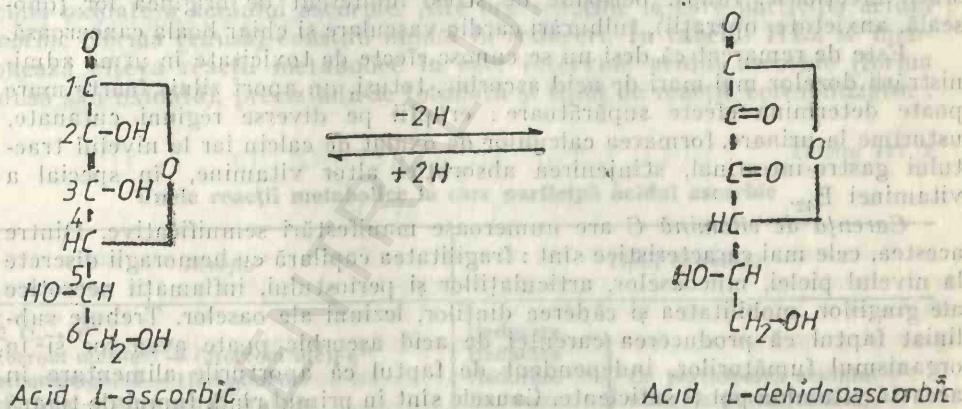


Fig. III.28. — Acidul L-ascorbic și acidul L-dehidroascorbic.

Acidul ascorbic este o substanță cristalină, ușor solubilă în apă, formînd soluții acide. Este de remarcă că aciditatea se datorește disocierii de ioni  $H^+$  de la grupele enolice (căci carboxilul este blocat în legătura lactonică). Acidul ascorbic prezintă spectru de absorbție în ultraviolet și este optic-activ (dextrogir). Acidul ascorbic este o substanță reducătoare care se oxidează ușor în aer și soluții (mai ales, în mediu alcalin) trecînd în acid dehidroascorbic. Acesta îl regenerează prin reducere, după cum s-a arătat în fig. III.28.

Dintre vitaminele hidrosolubile, vitamina C este socotită cea mai puțin stabilă. În mod deosebit ea este labilă la încălzire, în prezența urmelor de metale (în special cupru). În schimb, vitamina C este stabilă la temperaturi scăzute, chiar cele de înghețare ale produselor care o conțin.

### *Răspîndire*

De foarte multă vreme se știe că scorbutul se datorează lipsei din hrană a legumelor și fructelor proaspete. Într-adevăr, sursele obișnuite de procurare a vitaminei C sînt legumele (tomate, varză, spanac, ardei) și fructele; în special, citricele și pepenele galben. Vitamina C se găsește în cantități apreciabile și în boabele de măcieș, iar în cantitate mai mică în colostru și laptele uman.

### *Necesarul de vitamină C*

Necesarul zilnic de vitamină C al omului sănătos se consideră a fi de 1 mg acid ascorbic/kilocorp. În general, necesarul de vitamină C al organismului uman variază, nu numai în raport cu greutatea dar și cu vîrsta, activitatea fizică depusă, ritmul metabolic și stările fiziologice speciale (sarcină, alăptare). În cazurile unor disfuncții sau maladii aporturile de vitamină C trebuie sporite apreciabil. Astfel de situații sînt: unele boli virale (printre care și gripa), stări infecțioase, răniri, perioade de stres, indiferent de originea lor (oboseală, anxietate, operații), tulburări cardio-vasculare și chiar boala canceroasă.

Este de remarcă că deși nu se cunosc efecte de toxicitate în urma administrării dozelor mai mari de acid ascorbic, totuși, un aport zilnic foarte mare poate determina efecte supărătoare: erupții pe diverse regiuni cutanate, usturime la urinare, formarea calculilor de oxalat de calciu iar la nivelul tractului gastro-intestinal, stînjeneria absorbției altor vitamine, în special a vitaminei B<sub>12</sub>.

*Carența de vitamină C* are numeroase manifestări semnificative. Dintre acestea, cele mai caracteristice sînt: fragilitatea capilară cu hemoragii discrete la nivelul pielii, mucoaselor, articulațiilor și periostului, inflamații necrotice ale gingiilor, mobilitatea și căderea dinților, leziuni ale oaselor. Trebuie subliniat faptul că producerea carenței de acid ascorbic poate avea loc și în organismul fumătorilor, independent de faptul că aporturile alimentare în această vitamină pot fi suficiente. Cauzele sînt în primul rînd, fumul de țigară care împiedecă absorbția vitaminei C, iar pe de altă parte, nicotina care scade considerabil (cu 24—31%) ascorbemia (concentrația vitaminei C în sînge).

### *Metabolism*

Vitamina C din alimentele consumate este absorbită repede la nivelul intestinului. Diverși factori au însă capacitatea de a scădea sau chiar împiedeca absorbția normală a vitaminei C. Printre aceștia, se numără: antibioticele (administrate prelungit), cortizonul, aspirina, medicamentele calmante,

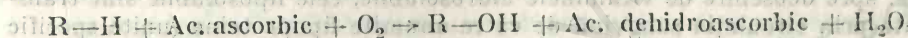


înhalarea fumului de petrol ars sau a fumului de tutun, starea de stres, expunerea la temperaturi ridicate. Cercetări recente (1986) au dovedit că acidul ascorbic eliberat în lumenul intestinal sub formă de acid dehidroascorbic, precum și cel aflat sub aceeași formă în sânge, suferă în peretele intestinal reducere și, ca atare, trece în circulația sanguină care-l transportă în tot organismul. Este de remarcat faptul că din aportul alimentar organismul își reține numai cantitatea strict necesară de acid ascorbic (ascorbemia normală fiind de 1 mg/100 ml sânge), iar excesul se elimină prin urină, sub ambele forme (oxidată și redusă). Excreția de oxalat urinar, precum și formarea oxalatului de calciu insolubil pot fi atribuite, în anumită măsură, acidului ascorbic deoarece, în organism, o parte din el este transformat în acid oxalic.

### Rolul vitaminei C în organism

Ca atare sau sub formă oxidată, vitamina C participă la reacții multiple pe care le suferă în organism diverse categorii de compuși importanți din punct de vedere biochimic: aminoacizi, nucleotide, hormoni, vitamine, coenzime, ioni metalici.

Majoritatea reacțiilor care au loc cu participarea acidului ascorbic (forma redusă) sînt hidroxilări în care este implicat și oxigen molecular:



Se cunosc însă și hidroxilări care se fac pe seama acidului dehidroascorbic. În aceste cazuri, odată cu hidroxilarea altei substanțe are loc și reducerea formei oxidate a acidului ascorbic. Alte ori, reacțiile la care participă acidul ascorbic (forma redusă) constau numai în reduceri. În tabelul III.2 se menționează cîteva reacții metabolice în care intervine acidul ascorbic (forma redusă sau oxidată), precizîndu-se totodată și tipul de reacție corespunzător:

Tabelul III. 2

Unele reacții metabolice la care participă acidul ascorbic

Reacția	Tipul de reacție
$1/2 O_2 \rightarrow O^{2-}$	Reducere
Citocrom a(c)Fe <sup>3+</sup> → Citocrom a(c)Fe <sup>2+</sup>	Reducere
Metemoglobină → Hemoglobină	Reducere
Acid folie → Acid tetrahidrofolie	Reducere
* Prolină → Hidroxiprolină	Hidroxilare
* Lizină → Hidroxilizină	
Steroid → Hidroxisteroid	Oxidare cu participarea acidului dehidroascorbic
Triptofan → 5-Hidroxitriptofan	

\*. Reacții importante în biosinteza colagenului (vezi țesutul conjunctiv).

Pe lângă reacțiile menționate în tabel, acidul ascorbic intervine și în diverse alte reacții de oxido-reducere în care funcționează cuplat cu glutat-ionul sau coenzimele nicotinamidice și flavinice. Un rol important îl are

acidul ascorbic în degradarea oxidativă a aminoacidului tirozină, precum și în formarea (tot din tirozină) hormonului medulosuprarenalian, adrenalina. În ambele procese vitamina C intervine ca un cofactor activator al anumitor enzime (vezi Catabolismul tirozinei și Biosinteza adrenalinei).

### III.4. VITAMINELE LIPOSOLUBILE

Spre deosebire de vitaminele hidrosolubile, cele liposolubile au molecule apolare, hidrofobe. Din punct de vedere structural, toate vitaminele liposolubile sînt derivați izoprenici. În organism, vitaminele liposolubile provenite din alimentele ingerate se comportă la fel cu grăsimile rației și utilizarea lor depinde, în mare măsură, de întreg metabolismul normal al lipidelor. Astfel, pentru a fi absorbiți din intestin, vitaminele liposolubile necesită absorbția normală a grăsimilor din hrană. De aceea, tulburările biliare și steatoarea conduc adesea și la absorbția defectuoasă a vitaminelor liposolubile. Cînd absorbția este bună, ele sînt transportate, prin chilomicroni, la ficat și apoi depozitate; în ficat vitaminele A, D și K iar în țesutul adipos vitamina E. Este de remarcat că, spre deosebire de vitaminele hidrosolubile, cele liposolubile sînt transportate prin circulația sangvină de către anumite lipoproteine (unite specifice cu ele) și apoi prin intermediul bilei ajung din nou în intestin, de unde sînt excretate prin fecale. Datorită faptului că vitaminele liposolubile sînt depozitate în organism, supradozarea lor, impusă în anumite situații, conduce la declanșarea unor stări de toxicitate, mai ales, în cazul vitaminelor A și D.

#### III.4.1. VITAMINA A (RETINOLUL)

Vitamina A este necesară animalelor superioare pentru promovarea creșterii, menținerea vederii, protejarea mucoaselor și epitelilor. De asemenea, vitamina A este esențială în procesul de reproducere deoarece în lipsa ei are loc o degenerescență glandulară caracteristică și chiar sterilitatea.

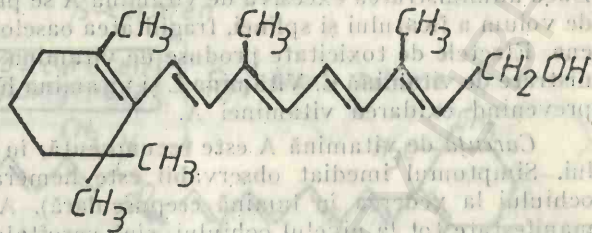
Numele de *vitamină A* este generic, valabil pentru mai multe vitame: ale sale, avînd activitate biologică asemănătoare cu a vitaminei A<sub>1</sub> (primul produs izolat). Vitaminei A<sub>1</sub> i se mai spune *retinol*. Acest nume este în legătură cu faptul că un derivat imediat al său, retinalul, intră în constituția bastonașelor din retină (vezi, mai departe, rolul retinalului în procesul vederii crepusculare). Vitaminei A i s-a spus și *xerofol* pentru că lipsa ei din organism determină xerofthalmia (cheratinizarea celulelor epiteliale din conjunctivă și corneă, asociată cu procese infecțioase). Actualmente, există tendința de introducere a termenului de *retinoide* pentru cuprinderea într-un singur grup atît a vitamerelor naturale cît și a substanțelor sintetice analoge retinolului.



### Constituție chimică

Vitamina A<sub>1</sub> este, din punct de vedere chimic, un derivat poliizoprenoidic care conține și nucleul ciclohexenului.

Fig. III.29 — Vitamina A<sub>1</sub> (retinolul).



Vitamina A are mai multe provitamine. Acestea sînt substanțe care, în organism, se transformă în vitamină. Provitaminele A sînt carotenii:  $\alpha$ -,  $\beta$  și  $\gamma$ . Ei sînt pigmenți de culoare galben-roz, aflați în anumite vegetale care fac parte din hrana obișnuită a omului. Carotenii sînt și ei compuși poliizoprenoidici cu nucleu ciclohexenic:

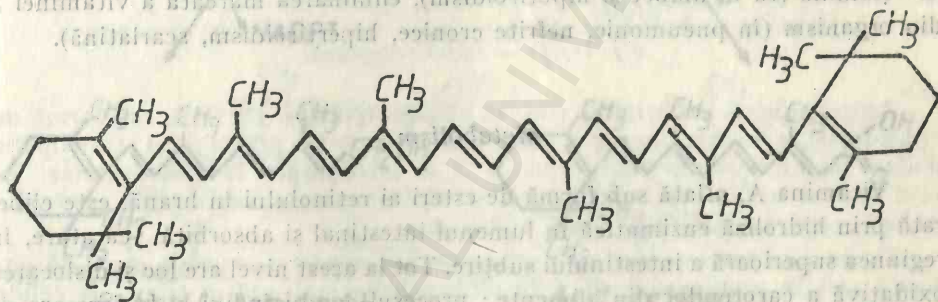


Fig. III.30 —  $\beta$ -carotenul.

### Răspîndire

Vitamina A, sub formă de provitamine (caroteni) se găsește, în special, în morcovi, salată verde, varză, spanac. Carotenii, împreună cu vitamina A, se află și în unele produse lactate (unt, smîntînă). Sursa cea mai bogată de vitamină A ca atare este uleiul din ficatul unor pești (așa-zisa untură de pește). Vitamina A se mai află și în ficatul altor animale precum și în gălbenușul de ou.

### Necesarul de vitamină A

Se consideră că necesarul zilnic de vitamină A al adultului este de 1,7 mg iar pentru copii, de 1 mg. În anumite stări fiziologice (sarcină, lactație) sau în unele boli (pneumonie, nefrită) necesarul zilnic de vitamină A este crescut,

putînd ajunge la 2,7 mg. Adesea, necesarul de vitamine liposolubile (în special A și D) este exprimat în unități internaționale (U.I.). În cazul vitaminei A, 1 U.I. = 0,344  $\mu$ g.

În cazul *supradozărilor* de vitamină A apar stări de toxicitate manifestate prin diverse simptome: indispoziție, vomă, diaree, căderea părului, prurit. Dacă administrarea excesivă de vitamină A se prelungește, se produc: mărirea de volum a ficatului și splinei, fragilitatea oaselor, reducerea activității tiroidiene. Efectele de toxicitate produse de vitamina A pot fi prevenite prin administrare de vitamină C. Vitamina C și vitamina E funcționează ca antioxidanți, prevenind oxidarea vitaminei A.

*Carența* de vitamină A este recunoscută, în primul rînd, la nivelul ochiului. Simptomul imediat observabil este hemeralopia (lipsa de adaptare a ochiului la vederea în lumină crepusculară). Alte simptome ale deficienței, manifestate tot la nivelul ochiului, sînt xeroftalmia și keratomalacia. Aceasta din urmă se caracterizează prin subfierea corneei, opacifierea și perforarea ei. Alte semne ale deficienței de vitamină A se observă la nivelul pielii și mucoaselor care suferă descuiamări iar la nivelul oaselor și dinților se constată pierderea durității normale.

Carența de vitamină A poate avea diverse cauze: aport dietar insuficient, absorbție sau depozitare defectuoase, imposibilitatea transformării carotenilor în vitamină (ca în diabet și hipotiroidism), eliminarea marcată a vitaminei A din organism (în pneumonie, nefrite cronice, hipertiroidism, scarlatină).

### Metabolism

Vitamina A, aflată sub formă de esteri ai retinolului în hrană, este eliberată prin hidroliză enzimatică în lumenul intestinal și absorbită, ca atare, în regiunea superioară a intestinului subțire. Tot la acest nivel are loc și dislocarea oxidativă a carotenilor din alimente; procesul conducînd și el la formare de retinol. Clivarea enzimatică a moleculei de  $\beta$ -caroten necesită participarea oxigenului (molecular) și a sărurilor biliare, așa cum se arată în fig. III.31.

În fig. III.31 se observă că o parte din retinal (provenit din  $\beta$ -caroten) este oxidată în intestin la stadiu de acid retinoic. Acesta este absorbit, trecut în circulația portă și nu se depozitează în ficat sau în alte țesuturi. În schimb, el poate fi metabolizat în compuși cu polaritate mai mare și apoi excretat prin bilă — intestin și prin urină.

Retinolul absorbit este reesterificat cu acizi grași, saturați, superiori și apoi încorporat în chilomicronii limfei care-l trec în torrentul sanguin. La nivelul ficatului, o parte din esterii retinilici sînt depozitați sub formă de retinil-palmitat. Din depozitul hepatic, retinolul este mobilizat la nevoie. În acest scop, are loc, mai întîi, o hidroliză a retinil-palmitatului, iar retinolul eliberat este transportat, ulterior, prin sînge la țesutul sau organul care-l solicită (acest transport se face sub forma unui complex al retinolului cu o apoproteină sintetizată în hepatocit).



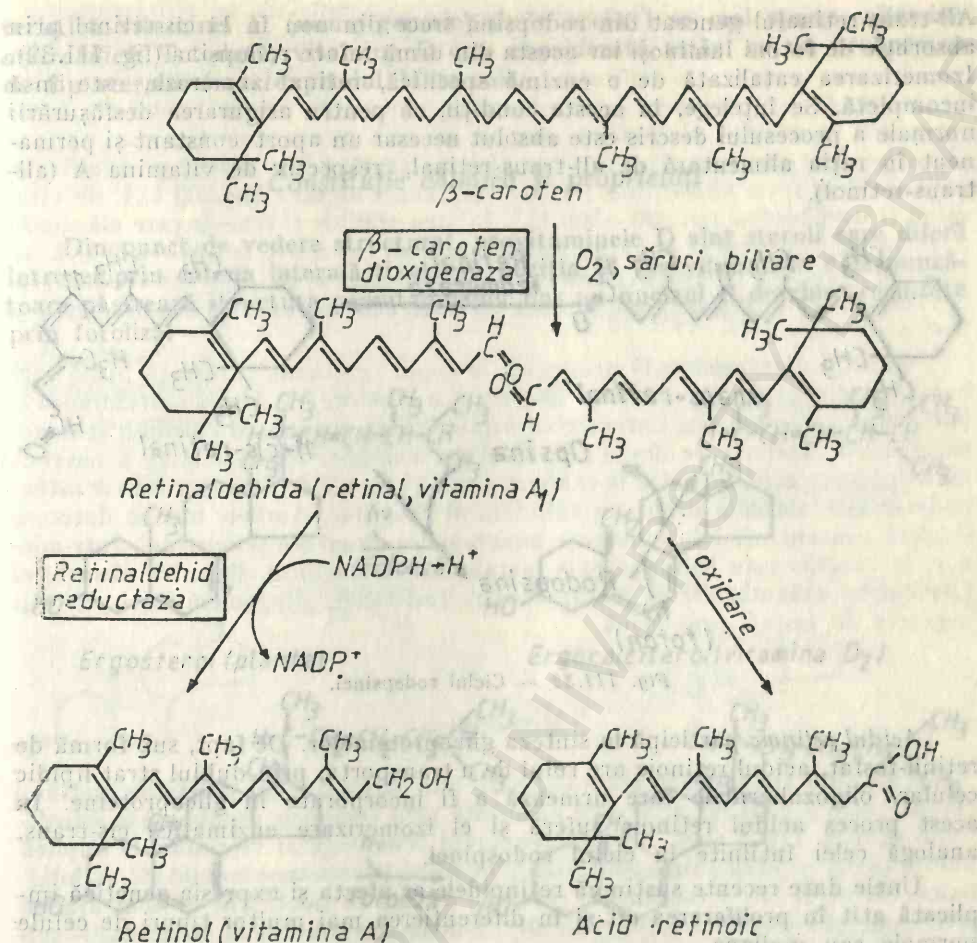


Fig. III.31 — Treccrea  $\beta$ -carotenului in retinol si formarea deriva\u021bilor inrudi\u021bi.

### Rolul vitaminei A in organism

Dintre retinoide, trei substan\u021be prezint\u0103 interes deosebit deoarece particip\u0103 la procesele biochimice importante, desf\u0103\u0219urate in organism. Aceste substan\u021be s\u00b0nt: retinolul, retinalul \u0219i acidul retinoic.

**Retinolul** (alcool) pare a avea ac\u021biune hormonal\u0103 decisiv\u0103 pentru func\u021bia de reproducere.

**Retinalul** (aldehid\u0103) este un component al pigmentului vizual *rodopsina*, din bastona\u0219ele retinei. In\u021br-adev\u0103r, rodopsina este constituit\u0103 dintr-o protein\u0103 simpl\u0103, *opsina* \u0219i 11-*cis*-retinal (fig. III.32).

Senza\u021bia vizual\u0103, mediat\u0103 de bastona\u0219e, ia na\u0219tere in urma absorb\u021biei cuantelor de lumin\u0103 de c\u0103tre rodopsin\u0103. In\u0219\u0103 absorb\u021bia luminoas\u0103 determin\u0103 descompunerea rodopsinei in opsin\u0103 \u0219i retinal cu structur\u0103 *trans*.

All-trans-retinalul generat din rodopsină trece din nou în 11-cis-retinal prin absorbție de fotoni luminoși iar acesta din urmă reface rodopsina (fig. III.32). Izomerizarea catalizată de o enzimă specifică, retinal-izomeraza, este însă incompletă. Se înțelege, în aceste condiții, că pentru asigurarea desfășurării normale a procesului descris este absolut necesar un aport constant și permanent în rația alimentară de all-trans-retinal, respectiv de vitamina A (all-trans-retinol).

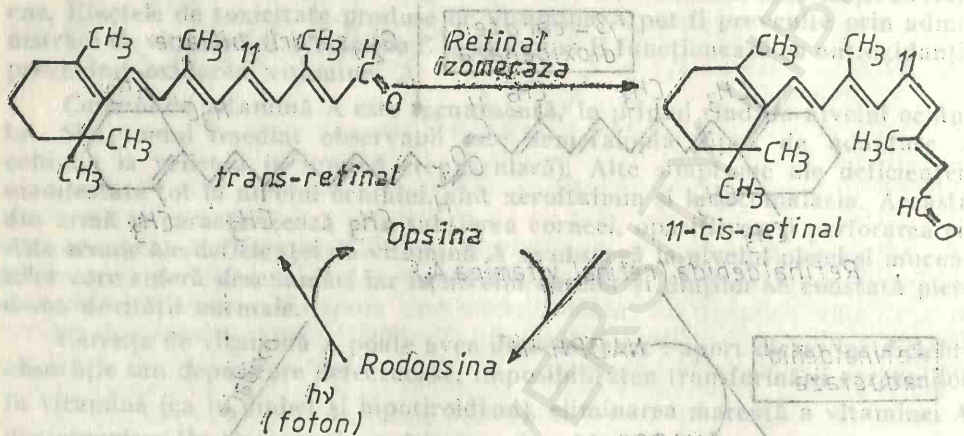


Fig. III.32 — Ciclul rodopsinei.

Acidul retinoic participă la sinteza glicoproteinelor. De fapt, sub formă de retinil-fosfat, acidul retinoic are rolul de a transporta, prin dublul strat lipidic celular, oligozaharidele care urmează a fi incorporate în glicoproteine. În acest proces acidul retinoic suferă și el izomerizare enzimatică cis-trans, analogă celei întâlnite în ciclul rodopsinei.

Unele date recente susțin că retinoidele ar afecta și expresia genetică implicată atât în proliferarea cit și în diferențierea mai multor tipuri de celule normale sau maligne.

#### III.4.2. VITAMINA D

Ca și vitamina A, vitamina D are mai multe vitamere și mai multe provitamine. Dintre ele, cele mai importante, din punct de vedere al acțiunii biologice și al rolurilor metabolice împlinite, sînt vitaminele  $D_2$  și  $D_3$ . Ele corespund provitaminelor ergosterol și 7-dehidrocoolesterol. Indicii (2 sau 3) sînt în legătură cu ordinea în care vitaminele D au fost izolate sau obținute prin iradierea cu lumină ultravioletă a provitaminelor corespunzătoare. Tocmai pentru a se sublinia această proveniență, vitaminei  $D_2$  i se mai spune ergocalciferol derivind din ergosterol, iar vitamina  $D_3$  se mai numește colecalciferol pentru că provine din 7-dehidrocoolesterol (vezi fig. III.33). Ambele vitamine,  $D_2$  și  $D_3$ , au activitate antirahitică egală. Această acțiune este carac-



teristică vitaminei D (nume generic) și de aceea i se mai spune *vitamina antirahitică*. Totodată, vitamina D este considerată astăzi ca un prohormon de tip sterolic (vezi capitolul Hormoni).

### Constituție chimică și proprietăți

Din punct de vedere structural, provitaminele D sînt steroli care diferă între ei prin catena laterală fixată în poziția 21 iar vitaminele corespunzătoare păstrează structura provitaminelor dar au nucleul B deschis: rezultate prin fotoliză.

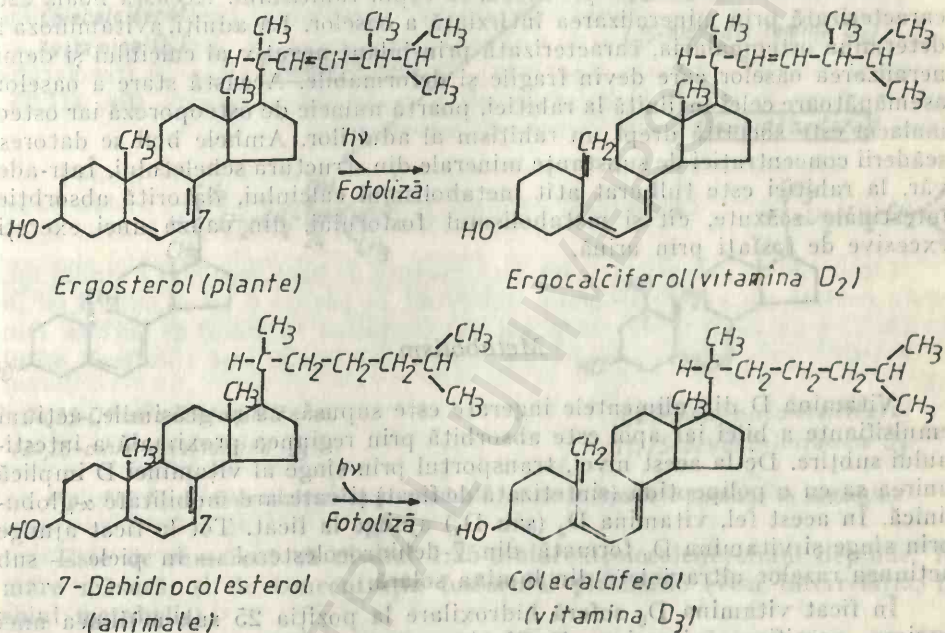


Fig. 111.33. — Structurile ergosterolului, 7-dehidrocolesterolului și ale vitaminelor D<sub>2</sub> și D<sub>3</sub> rezultate prin fotoliză.

**Vitamina D<sub>2</sub>** (ergocalciferolul) este o substanță solidă, incoloră, cristalină care se dizolvă ușor în grăsimi și solvenți organici. Expusă la aer sau la încălzire nu se descompune iar față de acizi vitamina D<sub>2</sub> este suficient de stabilă.

### Răspîndire

Sursele cele mai bogate în vitamină D (ca atare) sînt: uleiurile din ficatul anumitor pești (untura de pește), laptele, untul, smîntina, gălbenușul de ou, ficatul.

## Necesarul de vitamină D

La om, necesarul de vitamină D este împlinit, pe de o parte, de vitamina D<sub>3</sub> rezultată prin fotoliza 7-dehidro-colesterolului la nivelul pielei (în urma expunerii la radiații ultraviolete) iar pe de altă parte, de vitamina cuprinsă în alimentele ingerate. În ceea ce privește aceasta din urmă, se admite că pentru adult rația alimentară trebuie să procure zilnic 120—200 U.I. de vitamină D iar pentru copii 300—500 U.I. Pentru gravide și femeile care alăptează aportul de vitamină D al rației este necesar să fie mărit la 500—800 U.I./zi. Este de remarcat că aportul alimentar corespunzător nevoilor de vitamină D devine util în organism numai dacă în rație este adecvat și cel de calciu și fosfor (fosfați).

Carența de vitamină D provoacă, la copii, rahitismul. Această boală este caracterizată prin mineralizarea întârziată a oaselor. La adulți, avitaminoză D determină osteomalacia, caracterizată prin bilanț negativ al calciului și demineralizarea oaselor care devin fragile și deformabile. Această stare a oaselor, asemănătoare celei întâlnită la rahitici, poartă numele de osteoporoză iar osteomalacia este socotită drept un rahitism al adulților. Ambele boli se datorează scăderii concentrației de substanțe minerale din structura scheletului. Într-adevăr, la rahitici este tulburat atât metabolismul calciului, datorită absorbției intestinale scăzute, cât și metabolismul fosforului, din cauza unei excreții excesive de fosfați prin urină.

## Metabolism

Vitamina D din alimentele ingerate este supusă, ca și grăsimile, acțiunii emulsifiante a bilei iar apoi este absorbită prin regiunea proximală a intestinului subțire. De la acest nivel, transportul prin sânge al vitaminei D implică unirea sa cu o polipeptidă (sintetizată de ficat) și care are mobilitate  $\alpha$ -globulinică. În acest fel, vitamina D<sub>2</sub> (sau D<sub>3</sub>) ajunge la ficat. Tot la ficat ajunge prin sânge și vitamina D<sub>3</sub> formată din 7-dehidrocolesterol — în piele — sub acțiunea razelor ultraviolete din lumina solară.

În ficat vitamina D<sub>3</sub> suferă hidroxilare la poziția 25 sub acțiunea unei enzime specifice (vitamina D<sub>3</sub>-25-hidroxilaza). 25-hidroxi-colecalciferolul (25-hidroxi-vitamină D<sub>3</sub>) reprezintă forma cea mai abundentă de vitamină D aflată în circulația sanguină și din depozitul hepatic. O fracțiune apreciabilă din ea suferă circuit enterohepatic, ceea ce explică deficiența de vitamină D resimțită în tulburările acestui proces. Ulterior, 25-hidroxicolecalciferolul din sânge suferă o nouă hidroxilare, la poziția 1, sub acțiunea unei alte enzime specifice, 25-hidroxi-vitamină D<sub>3</sub>-1 $\alpha$ -hidroxilaza, aflată în tubulii renali, oase și placentă (Fig. III.34). Singura formă naturală de vitamină D care în condiții fiziologice obișnuite, poate menține nivelul calciului seric fără intervenție renală sau paratiroidiană între limite normale este considerată 1,25-dihidroxi-vitamină D<sub>3</sub>. Sub acțiunea unei alte enzime specifice aflată în tubulii renali, cartilagii, intestin și placentă 25-hidroxi-colecalciferolul poate fi hidroxilat și în poziția 24. Nivelul 24, 25-dihidroxicolecalciferolului în ser se află în relație reciprocă cu cel al 1,25-dihidroxicolecalciferolului.



Concentrațiile lor în singe sînt egale cînd concentrația calciului sîric este normală. De fapt, reglarea nivelului lor în singe se face direct de către hormonul paratiroidian și indirect de calciu sîric.

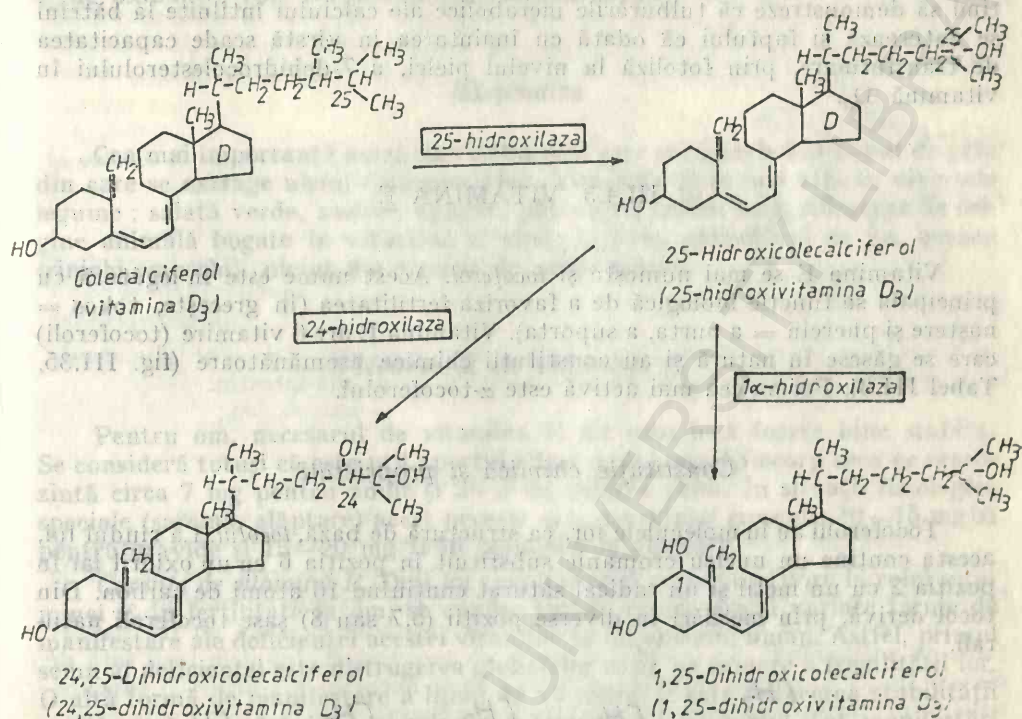


Fig. III.34 — Colecalciferolul și produșii lui de hidroxilare formați în organism.

Este de remarcă că nivelul 1,25-dihidroxicolecalciferolului depinde, în mare măsură, și de concentrația fosforului plasmatic (vezi interrelația, la rolul metabolic).

### Rolul vitaminei D în organism

Cele mai importante roluri ale vitaminei D în organism sînt în relație cu utilizarea calciului și fosforului (fosfaților). Într-adevăr, de la absorbție și transport pînă la utilizarea acestor elemente la nivelul oaselor, vitamina D intervine permanent prin compușii săi hidroxiilați. În special, la procesul de absorbție intestinală a calciului și fosforului la care participă 1,25-dihidroxi-vitamină D<sub>3</sub>. Intervenția sa se realizează în favoarea absorbției printr-un mecanism adevărat acțiunii hormonilor sterolici. La nivelul tubulilor renali 1,25-dihidroxi-vitamină D<sub>3</sub> favorizează reabsorbția fosfaților, contracarînd astfel procesul invers influențat de parathoron. Tot 1,25-dihidroxi-vitamină D<sub>3</sub> intervine și în mineralizarea țesutului osos, prin promovarea formării de hidroxiapatită. La acest ultim proces participă și 24, 25-dihidroxi-vitamină D<sub>3</sub>.

Prin urmare, orice proces metabolic care implică participarea calciului și fosforului în organism depinde, direct sau indirect, de prezența vitaminei D în cantități suficiente și în forme active din punct de vedere funcțional. Altfel, apar tulburările caracteristice carenței. Pe de altă parte, unele date recente tind să demonstreze că tulburările metabolice ale calciului întâlnite la bătrâni se datorează și faptului că odată cu înaintarea în vîrstă scade capacitatea de transformare, prin fotoliză la nivelul pielii, a 7-dehidrocolesterolului în vitamină D<sub>3</sub>.

### III.4.3. VITAMINA E

Vitamina E se mai numește și *tocoferol*. Acest nume este în legătură cu principala sa funcție biologică de a favoriza fertilitatea (în grecește, tokos = naștere și pherein = a purta, a suporta). Vitamina E are 6 vitamire (tocoferoli) care se găsesc în natură și au constituții chimice asemănătoare (fig. III.35, Tabel III.3). Forma cea mai activă este  $\alpha$ -tocoferolul.

#### Constituție chimică și proprietăți

Tocoferolii au în moleculele lor, ca structură de bază, *tocolul*. La rîndul lui, acesta conține un nucleu cromatic substituit în poziția 6 cu un oxidril iar în poziția 2 cu un metil și un radical saturat conținînd 16 atomi de carbon. Din tocol derivă, prin metilări în diverse poziții (5,7 sau 8) șase tocoferoli naturali.

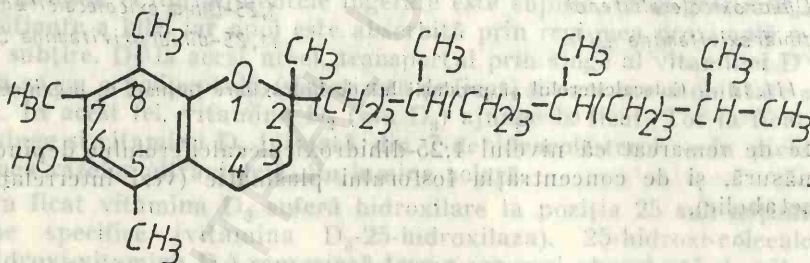


Fig. III.35 —  $\alpha$ -tocoferolul.

Tabel III.3

#### Constituția chimică a tocoferolilor

Tocoferol	Poziții substituite și nume
$\alpha$ (alfa)	5,7,8-trimetil-tocol
$\beta$ (beta)	5,8-dimetil-tocol
$\gamma$ (gamma)	7,8-dimetil-tocol
$\delta$ (delta)	8-metil-tocol
$\epsilon$ (eta)	7-metil-tocol
$\zeta$ (zeta)	5,7-dimetil-tocol



Tocopherolii sînt substanțe uleioase, cu mare vîscozitate, insolubile în apă. Sînt compuși stabili în aer, la lumină, la încălzire pînă peste 100° și față de acizi. Tocopherolii sînt descompuși de radiațiile ultraviolete, de hidrații alcalini și de oxidanți. Toți tocopherolii sînt antioxidanți.

### Răspîndire

Cea mai importantă sursă de vitamină E este germenul de bobul de grâu din care se extrage uleiul corespunzător. Vitamina E se mai află în diversele legume : salată verde, andive, spanac, pătrunjel, fasole, soia. Alimente de origine animală bogate în vitamină E sînt : laptele, gălbenușul de ou, carnea (rinichi, mușchi), uleiul din ficatul de pește marin.

### Necesarul de vitamină E

Pentru om, necesarul de vitamina E nu este încă foarte bine stabilit. Se consideră totuși că este util aportul zilnic de 0,1 mg/Kilocorp ceea ce reprezintă circa 7 mg pentru adult și 2—3 mg pentru copii. În situații fiziologice speciale (sarcină, alăptare) acest necesar este apreciabil crescut : 10—15 mg/zi pentru gravide și 15—20 mg/zi în perioada de alăptare.

**Carența de vitamină E.** Deși nu există dovezi certe cu privire la rolul vitaminei E în fertilitate la om, se cunosc totuși numeroase și variate forme de manifestare ale deficienței acestei vitamine în organismul uman. Astfel, primul semn al deficienței este distrugerea globulelor roșii, ca urmare a fragilității lor. O altă formă de manifestare a lipsei de vitamină E este reducerea stabilității membranelor și sărăcirea în collagen a țesutului conjunctiv. Tot manifestări ale deficienței sînt : reducerea musculaturii, depozitari anormale de grăsimi, imposibilitatea utilizării mai multor aminoacizi, reducerea activității glandelor suprarenale și a hipofizei. În caz de avitaminoză E are loc și degenerarea țesutului testicular, ceea ce conduce adesea la sterilitate. La femeile gravide, în avitaminoză E se pot constata nașteri premature iar copiii nou-născuți sînt susceptibili la anemii hemoragice (eritrocitele respective suferind ușor hemoliză). În sfîrșit, avitaminoză E poate conduce și la boli de inimă, ateroscleroză și chiar la cancer.

### Metabolism

Vitamina E din alimentele ingerate este absorbită la nivelul intestinului subțire și apoi transportată de sînge la ficat și alte organe. Se consideră că transportul vitaminei se face prin înglobare în chilomicroni iar după eliberarea din ei este preluată de lipoproteine. Date recente tind să arate că fosfolipidele din mitocondrii, reticulul endoplasmatic și membranele plasmatice posedă afinități deosebite (specifice) pentru  $\alpha$ -tocopherol, ceea ce duce la concluzia că vitamina E se concentrează în aceste formațiuni.

În ceea ce privește excreția vitaminei E din organism este de remarcă că molecula sa suferă, în prealabil, o degradare oxidativă atât la nivelul nucleului cromanic, cât și la nivelul catenei. Spre exemplu, din  $\alpha$ -tocoferol — prin oxidare — se formează produsul prezentat în fig. III.36.

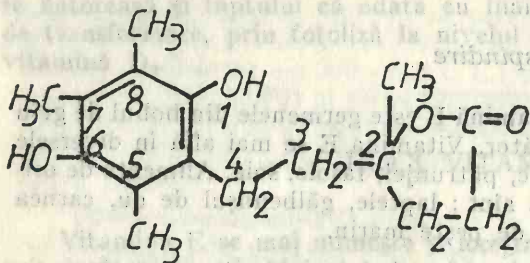


Fig. III.36 — Produsul de oxidare al  $\alpha$ -tocoferolului.

Odată format, acest produs de oxidare este conjugat cu acid glucuronic la cele două grupări fenolice și apoi excretat prin bilă-intestin.

### Rolul vitaminei E în organism

În multiple experiențe, efectuate pe animale, s-a dovedit că vitamina E are un puternic efect asupra organelor de reproducere : mărește fertilitatea la femele și masculi și ajută la restaurarea activității sexuale la masculi.

În organismul uman s-a demonstrat că vitamina E joacă un rol important, ca antioxidant. În această calitate, ea protejează globulele roșii față de diverși toxici oxidanți ; previne oxidarea unor hormoni hipofizari și suprarenalieni, precum și oxidarea altor substanțe care sînt utile ca atare ; spre exemplu, vitamina A și acizii grași esențiali.

Un alt rol specific al vitaminei E în organism este intervenția sa în metabolismul seleniului. Mecanismul acestei intervenții nu este complet elucidat dar s-a remarcă conlucrarea seleniului cu vitamina E în procese antioxidante. Spre exemplu, în calitate de component al glutation-peroxidazei, seleniul participă și el la prevenirea acțiunii distructive a peroxizilor, alături de vitamina E.

### III.4.4. VITAMINA K

Vitamina K poartă acest indicator deoarece este necesară coagulării singelui (Koagulation's Vitamin). Pentru acest motiv i se mai spune și vitamina antihemoragică. Într-adevăr, carența vitaminei K determină predispoziția la hemoragii datorate prelungirii timpului de coagulare a singelui.

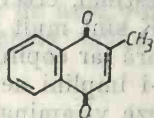
Ca și celelalte vitamine liposolubile, vitamina K are mai multe vitamere cu structuri chimice asemănătoare (vezi formulele). În primul rînd, există două vitamine K naturale importante : vitamina  $K_p$ , izolată din vegetale și



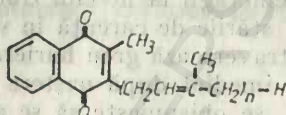
vitamina K<sub>2</sub>, izolată din țesuturi animale și bacterii. De asemenea, ftiocolul, constituent al membranelor lipidice din bacilul Koch, are și el activitate de vitamină K. Alături de acestea, există numeroși produși de sinteză folosiți în terapeutică și care, au constituții chimice asemănătoare iar activități de vitamină K cel puțin egale cu cele ale produșilor naturali. În această categorie intră menadiona și unii derivați funcționali ai săi (vezi formulele).

### Constituție chimică și proprietăți

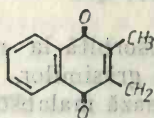
În constituția lor moleculară vitaminele K naturale cuprind nucleul p-naftochinonei substituit în poziția 2 cu un radical metil iar în poziția 3 cu un radical poliizoprenoidic. Produșii de sinteză nu conțin în moleculele lor radicali poliizoprenoidici:



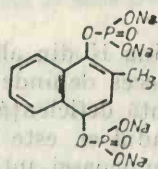
Menadiona (vitamină K<sub>3</sub>)



Menachinona (vitamină K<sub>2</sub>; n=6, 7 sau 9)



Filochinona (vitamină K<sub>1</sub>)



Menadiol-difosfatul de sodiu

Fig. III.37 — Structurile vitaminelor K naturale și de sinteză.

Vitamina K<sub>1</sub> este un lichid viscos, galben, solubil în solvenții grăsimilor. De asemenea, el este instabil la lumină și în aer se oxidează. Vitamina K<sub>1</sub> se descompune și sub acțiunea hidroxizilor alcalini.

Vitamina K<sub>2</sub> este o substanță solidă, prezentându-se sub formă de cristale galbene, ; are aceleași proprietăți chimice ca și vitamina K<sub>1</sub>.

### Răspindire

Vitamina K<sub>1</sub> se află în frunzele verzi ale unor vegetale, în uleiurile extrase din diverse plante și în tărițele de grâu. Vitamina K<sub>2</sub> este sintetizată de microorganisme. La om, ea este produsă de flora bacteriană din intestin. Vitaminele K naturale se mai află în lapte, gălbenuș de ou, melasă, ulei de ficat de pește și în alte uleiuri polinesaturate (vegetale).

## *Necesarul de vitamină K*

Necesarul zilnic de vitamină K al adultului se apreciază a fi de 2 mg. Acesta este asigurat, în organismul sănătos, de producția bacteriilor intestinale și de aportul alimentar obișnuit. În terapeutică se folosesc doze mai mari de vitamină K (sintetică) pentru prevenirea și oprirea hemoragiilor.

Este însă de remarcat că excesul de vitamină K sintetică poate produce reacții toxice: roșeață și transpirație abundentă, albuminurie și porfirinurie. La copii, prin administrare de menadionă în exces, s-au constatat fenomene hemolitice. În schimb, vitamina K naturală poate fi depozitată în cantități mai mari în organism, fără a provoca nici un fel de toxicitate.

**Carența.** Când absorbția intestinală a vitaminei K este tulburată, când flora intestinală este distrusă, sau când vitamina K nu poate fi utilizată în ficat, apar deficiențe cu urmări pentru întreg organismul. Astfel, se produce hipoprotrombinemie, ceea ce conduce la prelungirea timpului de coagulare și se declanșează hemoragii la nivelul tractului intestinal, creierului și măduvei. La nou-născut, stările de carență în vitamina K sînt mult mai frecvente deoarece vitamina traversează greu bariera placentară iar copilul nu are flora intestinală formată imediat după naștere pentru a-i împlini nevoile de vitamină K. Preventiv, se obișnuiește să se administreze vitamina K mamei în perioada ce precede nașterea, precum și copilului imediat după naștere.

## *Metabolism*

Vitamina K din alimentele ingerate este absorbită la nivelul jejunului și acest proces depinde de absorbția normală a grăsimilor. Într-adevăr, cea mai frecventă deficiență de vitamină K se datorează malabsorbției grăsimilor care, la rîndul ei, este asociată cu disfuncția pancreatică, obstrucții biliare, atrofierea mucoasei intestinale sau altor diverse cauze de steatoză. După absorbție, vitaminele K naturale, împreună cu lipidele, trec în limfă și apoi în sînge care le duce la ficat. Vitaminele K de sinteză trec direct în torrentul sanguin (fiind hidrosolubile). Ficatul este principalul organ de depozitare al vitaminei K; în alte organe (splină, rinichi, plămîni, mușchi, piele) depozitarea se face în mult mai mică măsură. Vitaminele K de sinteză nu se acumulează în ficat; excesul lor se elimină prin urină sub formă de glucurono-conjugări.

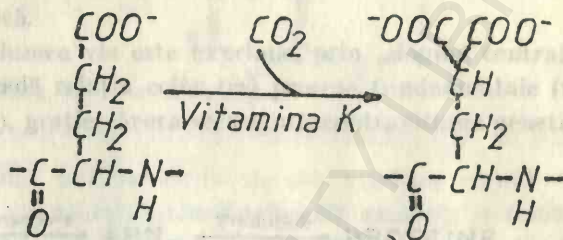
## *Rolul vitaminei K în organism*

Cea mai importantă funcție a vitaminei K în organism este considerată implicarea sa în procesul coagulării. Într-adevăr, după cum se știe, la formarea fibrinei participă protrombina iar la biosinteza protrombinei intervine vitamina K. Cercetări relativ recente au demonstrat că această vitamină nu este implicată numai în biosinteza protrombinei (factorul II), dar și în cea a altor factori de coagulare (VII, IX, X). Toți acești factori ai coagulării sînt biosintetizați în ficat, sub forma unor precursori inactivi care devin biologic-activi prin intervenția vitaminei K. De fapt, ulterior procesului de traducere a mesajului m-ARN în secvența aminoacizilor din proteinele specifice care



constituie factorii de coagulare, intervine vitamina K. Ea ajută la modificarea resturilor de acid glutamic în resturi de acid  $\gamma$ -carboxiglutamic. Modificarea constă într-o carboxilare care se face pe seama dioxidului de carbon, în microsomi ficatului, sub acțiunea catalitică a carboxilazei, în prezență de oxigen, cu vitamina K (forma hidrochinonică) drept co-factor al enzimei :

Fig. III.38 — Carboxilarea resturilor de acid glutamic în resturi de acid  $\gamma$ -carboxiglutamic, din factorii de coagulare, prin intervenția vitaminei K.



Resturile de acid  $\gamma$ -carboxi-glutamic (protrombina conține 10 asemenea resturi) pot chela calciu :

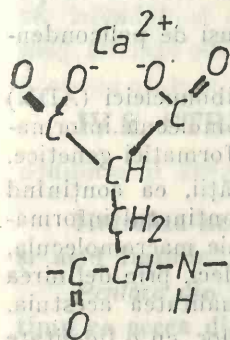


Fig. III.39 — Chelarea ionului de calciu de către acidul  $\gamma$ -carboxi-glutamic.

Acest proces de fixare a calciului este esențial pentru rolul biologic al factorilor de coagulare.

De curind s-a constatat că pe lângă factorii de coagulare există și alte proteine care conțin resturi de acid  $\gamma$ -carboxi-glutamic formate prin intervenția vitaminei K. Acestea nu aparțin ficatului ci altor organe : oase (osteocalcina), rinichi, placentă, plămâni, splină.

Se consideră că în organism, vitamina K intervine și în procese de fosforilare. Printre acestea se situează și cea cuplată cu lanțul transportorilor de hidrogen și electroni (fosforilarea oxidativă). Posibilitatea participării vitaminei K la fosforilarea oxidativă se bazează și pe faptul că acest proces suferă decuplare, relativ ușor, sub acțiunea antivitaminelor K.

## Cap. IV. ACIZII NUCLEICI

### IV.1. INTRODUCERE

Acizii nucleici sînt, din punct de vedere chimic, produși de policondensare a unor unități denumite nucleotide.

Se cunosc două clase de acizi nucleici : acizi dezoxiribonucleici (ADN) și acizi ribonucleici (ARN). Atît ADN cît și ARN sînt macromolecule informaționale care permit stocarea, transmiterea și exprimarea informației genetice.

Molecula de ADN reprezintă baza chimică a eredității, ea conținînd informația genetică cu privire la biosinteza proteinelor. Conținutul informațional al ADN, inseris în secvența nucleotidelor ce constituie macromolecula, permite specificarea structurii fiecărei proteine, determină deci, prin definirea caracterelor morfofuncționale ale unui organism, individualitatea acestuia.

Transmiterea informației genetice de-a lungul generațiilor, cu o fidelitate ireproșabilă, este rezultatul capacității de autoreplicare a moleculei ADN în virtutea căreia molecula de ADN parental este copiată astfel încît să formeze două molecule fiice avînd o secvență nucleotidică, deci un conținut informațional, identic cu ADN parental.

Exprimarea informației genetice cuprinsă în molecula de ADN, în secvențe specifice de aminoacizi, deci în proteine, se realizează pe parcursul a două procese :

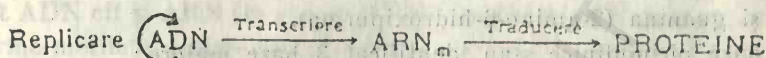
— transcrierea — constînd în rescrierea unor părți din mesajul genetic (segmente de ADN) sub forma unui ARN, denumit mesager. Acesta preia din nucleu mesajul genetic cu privire la biosinteza unei anumite proteine și-l aduce în citoplasmă, locul de biosinteză a proteinelor ;

— traducerea — în cursul căreia mesajul genetic, care se află înscris într-o succesiune de triplete (grup de trei nucleotide) din ARN<sub>m</sub>, este exprimat în secvență de aminoacizi. Fiecăruia dintre cei 20 de aminoacizi îi corespunde o succesiune de trei nucleotide, desemnată drept codon. Amplasarea aminoacizilor într-o secvență caracteristică unei proteine (codificată de un anumit



fragment de ADN și transcrișă într-un anumit ARN<sub>m</sub>) este asigurată de molecule de ARN „de transfer”, purtătoare ale unor triplete complementare cu diverși codoni din structura ARN<sub>m</sub>, denumite anticodoni. Acest ARN de transfer „adaptează” un anumit aminoacid, cel pe care-l transportă, în fața codonului de pe ARN<sub>m</sub> ce specifică aminoacidul dat, grație recunoașterii codon-anticodon. În felul acesta, fiecare aminoacid își găsește locul „consacrat” în polipeptidul în curs de sinteză.

Fluxul de informație în lumea vie este exprimat prin „dogma centrală” a geneticii moleculare, care redă relația celor trei procese fundamentale (replificare, transcriere, traducere), grație cărora se asigură continuitatea genetică a organismelor :

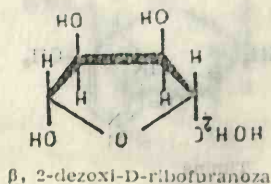
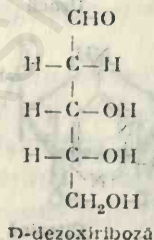
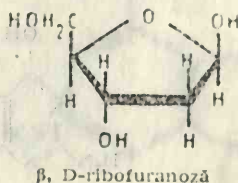
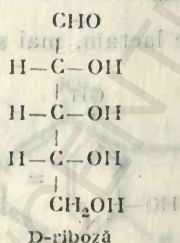


Descoperiri relativ recente completează substanțial imaginea oferită de „dogma centrală”, ținându-se seama de capacitatea de autoreplicare a unor tipuri de ARN ca și de cea de transcriere a informației din ARN în ADN.

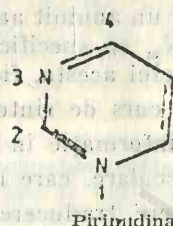
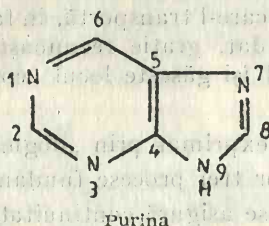
## IV.2. STRUCTURA CHIMICĂ A ACIZILOR NUCLEICI

Hidroliza acidă a acizilor nucleici dă naștere la baze azotate, pentoze și acid fosforic.

Pentoza din structura acizilor ribonucleici s-a dovedit a fi D-riboza, în timp ce aceea din structura ADN este D-dezoxiriboza. În structura acizilor nucleici, pentozele se găsesc sub formă ciclică,  $\beta$ -furanozică.



Bazele azotate care intră în structura acizilor nucleici derivă de la doi compuși heterociclici : purina și pirimidina.



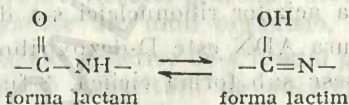
Bazele purinice din structura acizilor nucleici sînt adenina (6-amino-purina) și guanina (2-amino-6-hidroxipurina).

Ca baze pirimidinice s-au identificat 3 baze majore :

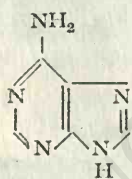
- uracil (2,4-dihidroxi-pirimidina)
- timina (2,4-dihidroxi-5-metil-pirimidina)
- citozina (2-hidroxi-4-amino-pirimidina).

Bazele purinice și pirimidinice prezintă fenomenul de tautomerie. Se numesc structuri tautomere două structuri care diferă una de cealaltă prin poziția unui atom de hidrogen și a unei duble legături. Bazele azotate prezintă

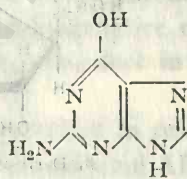
tautomerie lactim-lactam datorită grupei  $\text{—}\overset{\text{OH}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}=\text{N—}$  care există în echilibru cu forma  $\text{—}\overset{\text{O}}{\underset{\text{||}}{\text{C}}}\text{—NH—}$ .



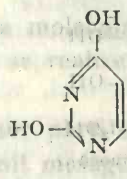
În structura acizilor nucleici se găsesc formele lactam, mai stabile.



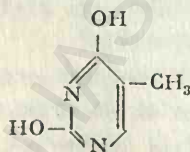
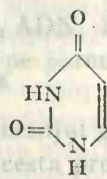
Adenină



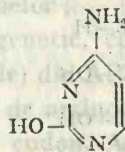
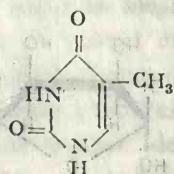
Guanină



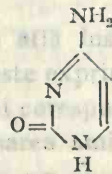
Uracil



Timină

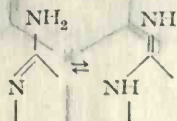


Citozină





Derivații aminați, care nu conțin grupări  $\text{—OH}$ , prezintă și ei tautomerie imino-amino, dar echilibrul este net deplasat în favoarea formei amino.



Ca atare, adenina se va prezenta sub forma amino.

De menționat că uracilul este baza pirimidinică specifică ARN, în timp ce timina este baza pirimidinică specifică ADN.

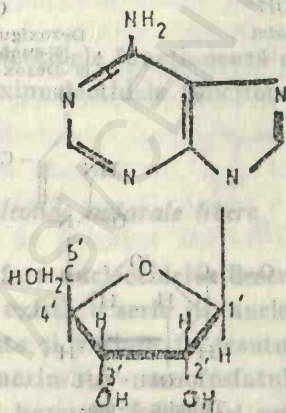
Atât ADN cât și ARN (în special ARN<sub>i</sub>) conțin și baze „minore” ce reprezintă forme metilate, tiolate sau glicozilate ale bazelor majore. Rațiunea prezenței lor în acizii nucleici va fi discutată ulterior.

Bazele azotate sînt molecule plane, relativ insolubile în apă. Prezintă un maxim de absorbție în ultraviolet între 252—271 nm, în funcție de natura bazei azotate și de pH, ceea ce permite determinarea cantității de acizi nucleici într-o probă.

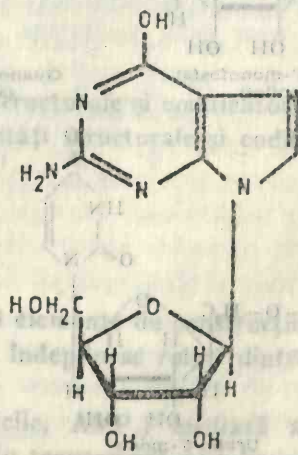
### Nucleozide și nucleotide

Nucleozidele sînt compuși ce rezultă prin stabilirea unei legături N-glicozidice între hidroxilul semiacetalic (de la C<sub>1'</sub>) al pentozei și atomul de azot din poziția 9 a unei baze purinice, sau din poziția 1 a unei baze pirimidinice.

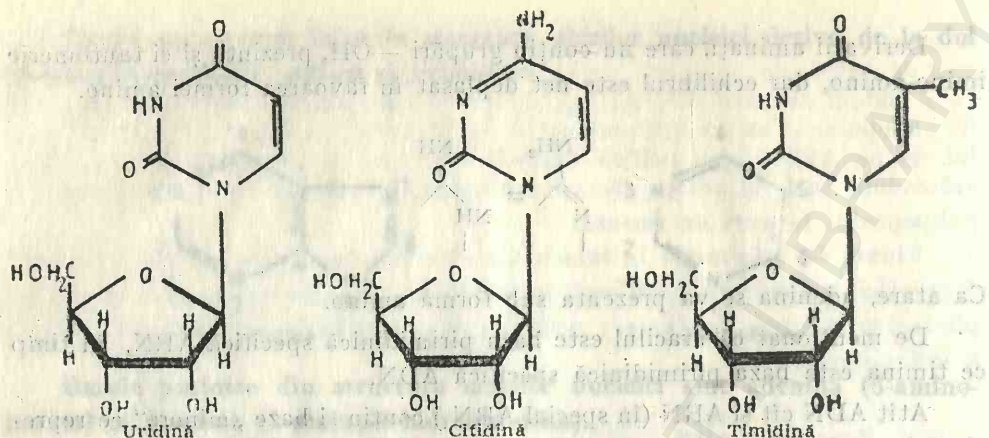
Ribonucleozidele conțin, ca pentoză,  $\beta$ -D-ribofuranoză, în timp ce dezoxiribonucleozidele conțin  $\beta$ , 2'-dezoxi-D-ribofuranoză.



Adenozină



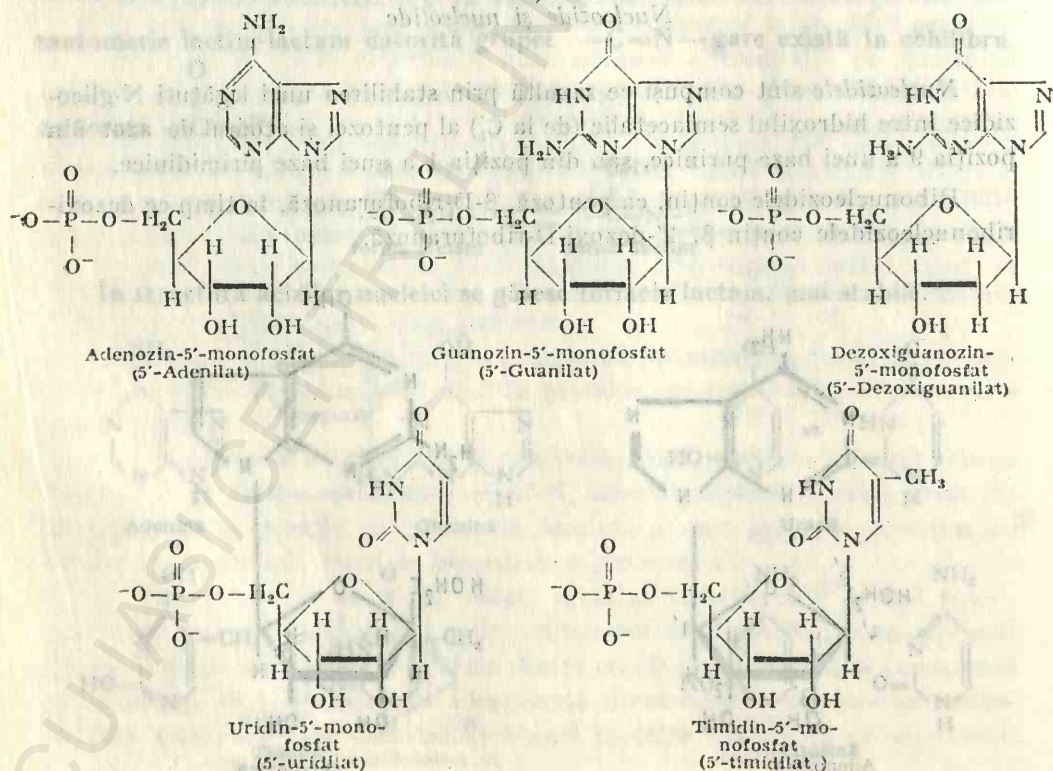
Guanozină



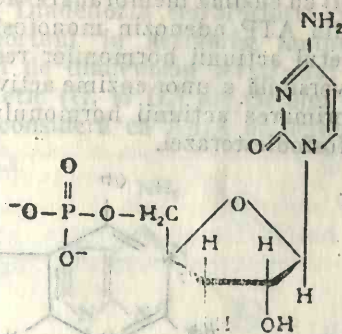
Dezoxiribonucleozidele se citește adăugând prefixul dezoxi la numele ribonucleozidului corespunzător. În unele nucleozide pirimidinice, denumite pseudonucleozide, legătura între pentoză și baza azotată se realizează prin intermediul C<sub>5</sub> și nu a N<sub>1</sub>.

Nucleotidele sînt esteri fosforici ai nucleozidelor la gruparea alcool de la C<sub>5'</sub> sau C<sub>3'</sub> a pentozei. În structura acizilor nucleici se întîlnesc nucleozid-5'-fosfați.

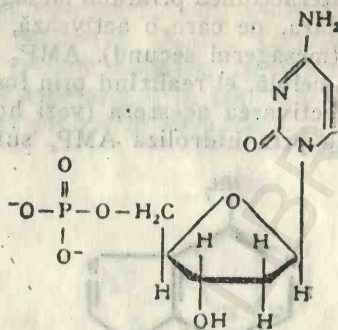
Nucleotidele din structura ADN conținînd dezoxiriboză se citește adăugînd prefixul dezoxi- la numele nucleotidului conținînd riboză (dezoxiadenozin-5'-monofosfat sau 5'-dezoxiadenilat).





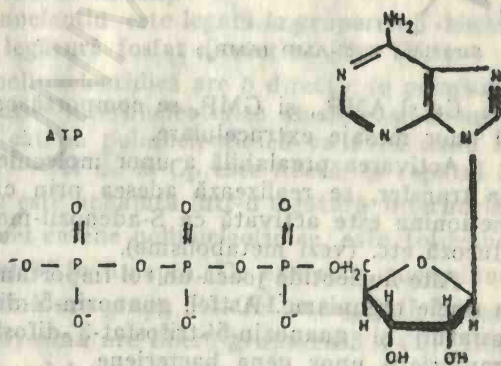
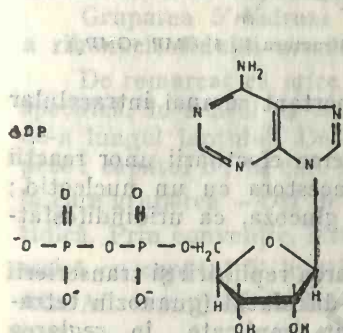


Citidin-5'mo-  
nofosfat  
(5'-citidilat)



Dezoxicitidin  
5'-monofosfat  
(5'-deoxici-  
tidilat)

Dacă un nucleozid este di- sau trifosforilat, se obțin nucleozid di- și tri- fosfați. De exemplu, în cazul adeninei se obțin adenozin-difosfatul (ADP) și adenozin-trifosfatul (ATP).



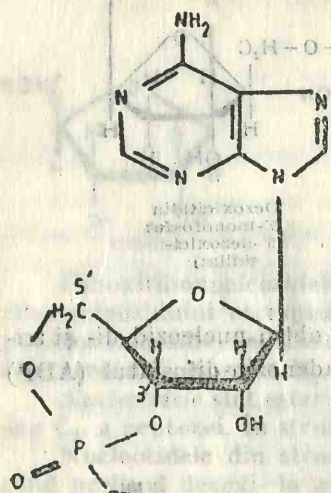
Nucleotidele funcționează ca unități structurale și codificatoare în ARN, iar dezoxinucleotidele funcționează ca unități structurale și codificatoare în ADN.

### Nucleotide naturale libere

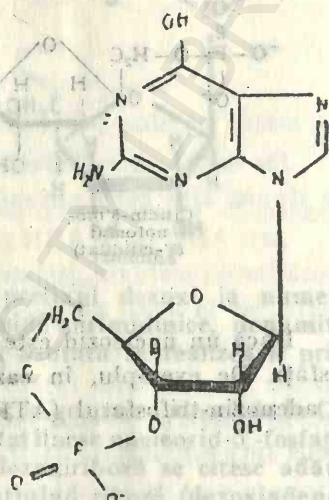
În afara nucleotidelor descrise ca fiind elemente de construcție a acizilor nucleici, există o serie de nucleotide care îndeplinesc roluri dintre cele mai importante și variate în țesuturi.

Adenozin-3',5'-monofosfatul (AMP ciclic,  $AMP_c$ ) mediază acțiunea a numeroși hormoni (mesageri primi) care nu traversează membrana celulară.

Prin interacțiunea primului mesager (hormonul) cu enzima membranară adenilat ciclaza, pe care o activează, ia naștere din ATP adenozin monofosfatul ciclic (mesagerul secund). AMP<sub>c</sub> este interpretul acțiunii hormonilor respectivi în celulă, el realizând prin fosforilarea reversibilă a unor enzime activarea sau inactivarea acestora (vezi hormoni). Suprimarea acțiunii hormonului se traduce prin hidroliza AMP<sub>c</sub> sub acțiunea fosfodiesterazei.



Structura 3', 5'-AMP (AMP<sub>c</sub>)

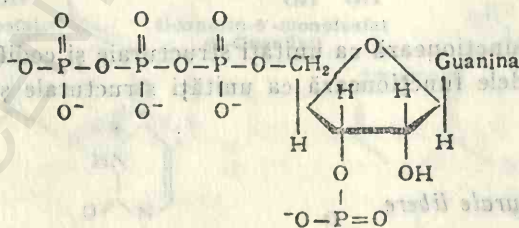


Structura 3', 5'-GMP (GMP<sub>c</sub>)

Ca și AMP<sub>c</sub> și GMP<sub>c</sub> se comportă ca un important semnal intracelular al unor mesaje extracelulare.

Activarea prealabilă a unor molecule, în vederea efectuării unor reacții de transfer, se realizează adesea prin cuplarea acestora cu un nucleotid; metionina este activată ca S-adenozil-metionină, glucoza, ca uridindifosfat-glucoză etc. (vezi metabolisme).

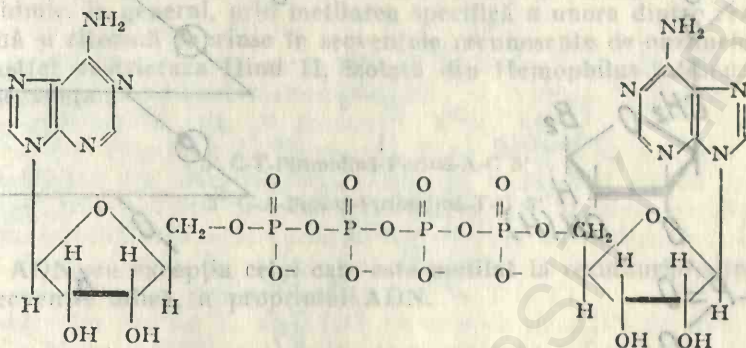
Alte nucleotide joacă un rol important în reglarea replicării și transcrierii la unele organisme. Astfel, guanozin-5'-difosfat-3'-difosfatul (guanozin tetrafosfatul) și guanozin-5'-trifosfat-3'-difosfatul sînt implicate în reglarea transcrierii unor gene bacteriene.



Guanozin-5'-trifosfat  
3'-difosfat



Diadenozin tetrafosfatul, relativ recent descoperit, este un dinucleotid important în activarea aminoacizilor și replicarea ADN. Concentrațiile mici de diadenozin tetrafosfat ( $Ap_4A$ ), în celulele animale, în fazele de gol sintetic ( $G_1$  și  $G_2$ ) ale ciclului celular, crește spectaculos în faza S a ciclului. Se consideră că  $Ap_4A$  ar acționa ca semnal pozitiv al creșterii.



$Ap_4A$

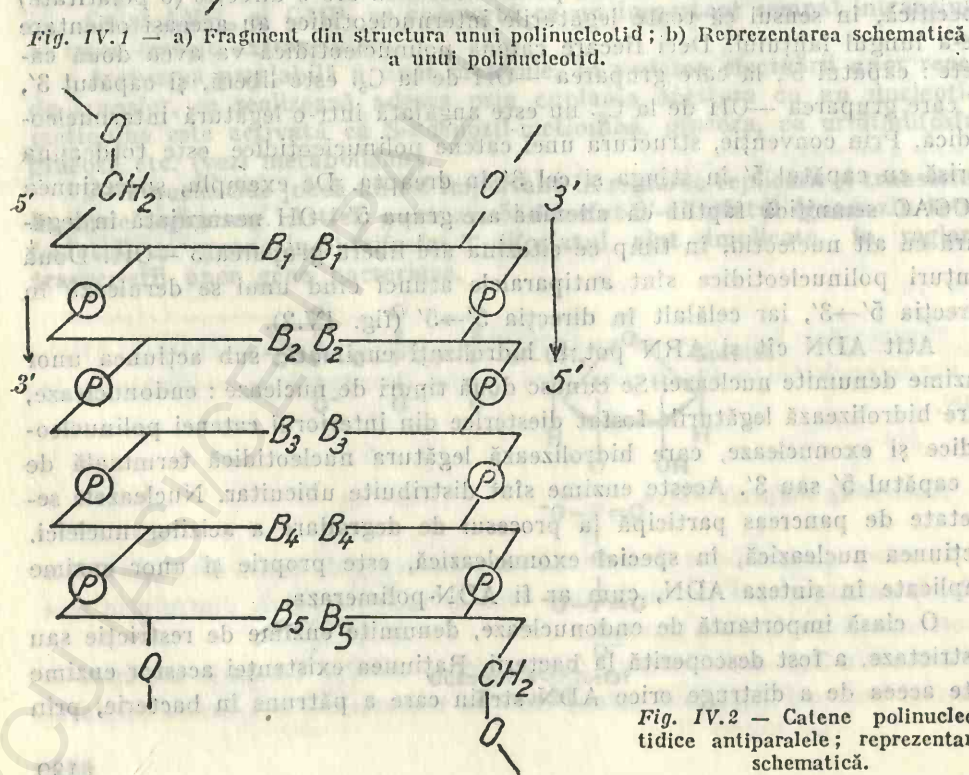
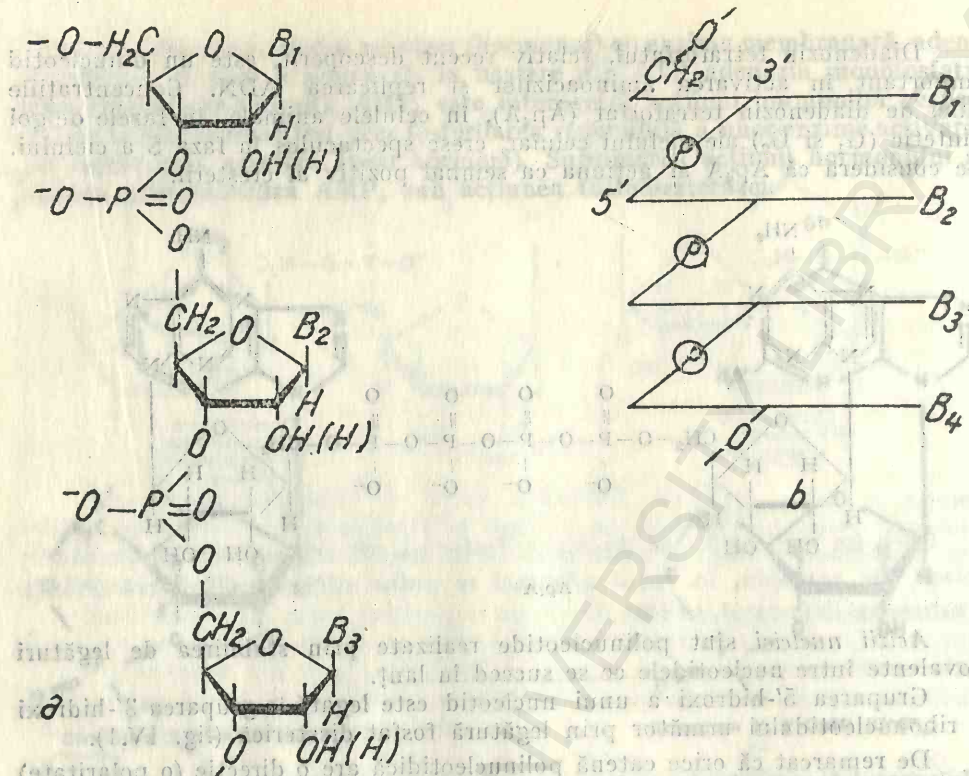
Acizii nucleici sînt polinucleotide realizate prin stabilirea de legături covalente între nucleotidele ce se succed în lanț.

Gruparea 5'-hidroxi a unui nucleotid este legată la gruparea 3'-hidroxi a ribonucleotidului următor prin legătură fosfat diesterică (fig. IV.1).

De remarcat că orice catenă polinucleotidică are o direcție (o polaritate) specifică, în sensul că toate legăturile internucleotidice au aceeași orientare de-a lungul lanțului. Deci fiecare catenă polinucleotidică va avea două capete: capătul 5', la care gruparea  $-OH$  de la  $C_5'$  este liberă, și capătul 3', la care gruparea  $-OH$  de la  $C_3'$  nu este angajată într-o legătură internucleotidică. Prin convenție, structura unei catene polinucleotidice este totdeauna scrisă cu capătul 5' în stînga și cel 3' în dreapta. De exemplu, succesiunea ACGAC semnifică faptul că adenina are grupa 5'- $-OH$  neangajată în legătură cu alt nucleotid, în timp ce citozina are liberă gruparea 3'- $-OH$ . Două lanțuri polinucleotidice sînt antiparalele atunci cînd unul se derulează în direcția 5'→3', iar celălalt în direcția 3'→5' (fig. IV.2).

Atît ADN cît și ARN pot fi hidrolizați enzimatic sub acțiunea unor enzime denumite nucleaze. Se cunosc două tipuri de nucleaze: endonucleaze, care hidrolizează legăturile fosfat diesterice din interiorul catenei polinucleotidice și exonucleaze, care hidrolizează legătura nucleotidică terminală de la capătul 5' sau 3'. Aceste enzime sînt distribuite ubicuitar. Nucleazele secrete de pancreas participă la procesul de degradare a acizilor nucleici. Acțiunea nucleazică, în special exonucleazică, este proprie și unor enzime implicate în sinteza ADN, cum ar fi ADN-polimeraza.

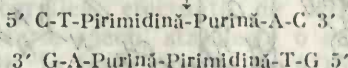
O clasă importantă de endonucleaze, denumite enzime de restricție sau restrictaze, a fost descoperită la bacterii. Rațiunea existenței acestor enzime este aceea de a distruge orice ADN străin care a pătruns în bacterie, prin





calitatea de a recunoaște secvențe de 4—6 nucleotide și a cliva, într-un loc specific, cite o legătură fosfat diesterică de pe fiecare catenă.

Numărul de enzime de restricție izolate și purificate este impresionant. Aceste „bisturie“ biochimice permit „tăierea“ selectivă a unor fragmente de ADN în scopul utilizării lor în tehnicile de clonare a ADN (vezi ingineria genetică). De remarcat faptul că bacteriile își „cruță“ propriul ADN, marcându-l chimic, în general, prin metilarea specifică a unora dintre reziduurile de adenină și citozină cuprinse în secvențele recunoscute de enzimele de restricție. Astfel, restrictaza Hind II, izolată din *Hemophilus influenzae*, taie specific secvența :



din orice ADN, cu excepția celui care este metilat la reziduurile adenină ale acestei secvențe, adică, a propriului ADN.

### IV.3. ACIZII DEZOXIRIBONUCLEICI

În 1868, Miescher a izolat, din celulele spermatice de pește, un compus conținând fosfor pe care l-a numit nucleină, fiind izolat din nucleii celulelor respective. Structura covalentă a grupării prostetice, care a primit numele de acid dezoxiribonucleic (ADN), a fost stabilită în jurul anilor 1940.

Cu totul revoluționară a fost însă demonstrarea de către Oswald Avery, Colin MacLeod și Maclyn McCarty, în 1943, a faptului că ADN este molecula eredității, că ea este purtătoarea informației genetice. ADN extrem de pur, extras dintr-un pneumococ virulent, provoacă transformarea genetică a unui suș nevirulent de pneumococ. Virulența câștigată de acesta din urmă este transmisă ereditar, prin includerea ADN injectat în ADN al celulei gazdă.

Informația genetică este înscrisă în secvența variabilă a nucleotidelor, elementele din care sînt constituiți acizii nucleici. ADN conține informația genetică completă pentru a specifica structura proteinelor unui organism. Definirea caracterelor morfologice și funcționale ale unei celule, al căror substrat este reprezentat de proteine, se realizează după programul înscris în ADN.

#### IV.3.1. STRUCTURA COVALENTĂ A ADN

Acizii dezoxiribonucleici sînt polidezoxiribonucleotide cu masă moleculară mare, în care gruparea 3'-hidroxi a unui dezoxiribonucleotid este legată la gruparea 5'-hidroxi a dezoxiribonucleotidului adiacent printr-o legătură fosfat diesterică (fig. IV.3).

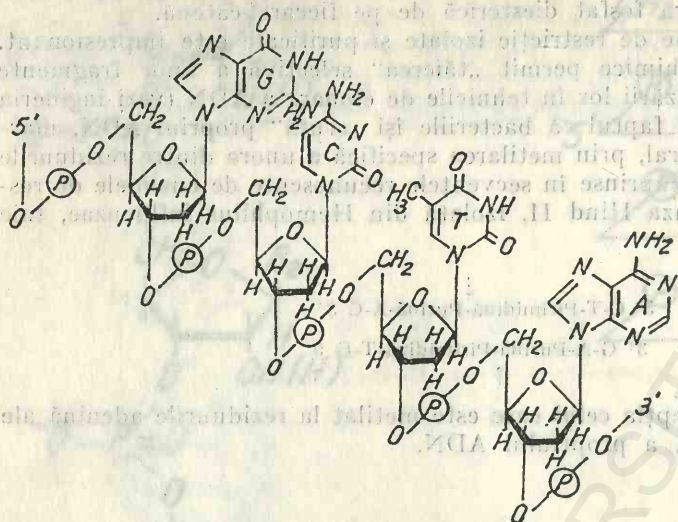


Fig. IV.3 — Structura covalentă a ADN.

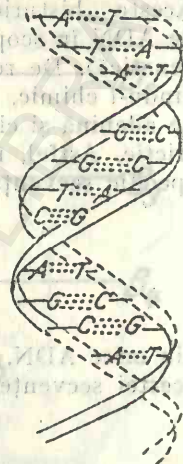
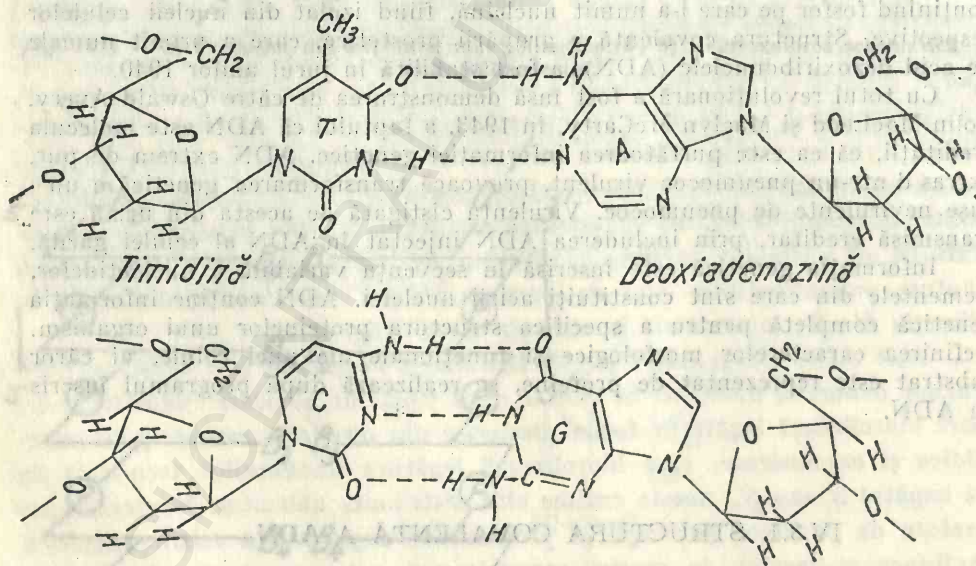


Fig. IV.4 — Structura dublu helico-  
idală a ADN.



Deoxicitidină

Deoxiguanozină

Fig. IV. 5 — Baze complementare unite prin legături de hidrogeni.

Fig. IV.6 — Catenă polinucleo-  
tomică antiparalelă; reprezentare  
schematică.



ADN conține 4 baze azotate și anume : adenina, guanina, timina și citozina. În secvența nucleotidelor corespunzătoare din macromoleculele de ADN este înscrisă informația genetică pe care acestea o cuprind.

#### IV.3.2. STRUCTURA SECUNDARĂ A ADN

În stabilirea structurii secundare a ADN decisive au fost cercetările întreprinse de Chargaff, Rosalind Franklin și Wilkins, ale căror concluzii le vom sumariza în cele ce urmează :

— analiza cromatografică, efectuată de către Chargaff pe molecule de ADN izolate din diverse specii, stabilește o anumită relație cantitativă între cele 4 baze azotate. În toate tipurile de ADN studiate numărul de reziduuri de adenină este egal cu cel al reziduurilor de timină, iar cel al reziduurilor de guanină cu cel de citozină ; numărul de baze purinice este egal deci cu cel de baze pirimidinice ( $A + G = T + C$ ) ;

— difracția razelor X, efectuată pe cristale de ADN de către Rosalind Franklin și Maurice Wilkins, a demonstrat existența a două perioade de identitate de-a lungul axei lungi a moleculei : una mare, de 3,4 nm și una mică, de 0,34 nm.

Pornind de la aceste date, cit și de la necesitatea de a oferi o interpretare moleculară capacității de reproducere a informației genetice conținută în molecula ADN, ca trăsătură caracteristică a acesteia, Watson și Crick au elaborat un model tridimensional al macromoleculei de ADN cu următoarele caracteristici (fig. IV.4) :

— două lanțuri polidezoxiribonucleotidice se răsucesc helicoidal și în același sens în jurul unui ax comun, formînd o dublă helice cu orientare dreaptă. Inelele glucidice, legate prin resturi fosfat, constituie scheletul extern al dublului helix, în timp ce bazele azotate, hidrofobe, sînt orientate spre interior și perpendicular pe axa helixului. Toate grupările fosfat la  $pH = 7$  sînt ionizate și încărcate negativ ;

— cilindrul ce încadrează dublul helix are un diametru de 2 nm ;

— distanța dintre planurile a două baze adiacente este de 0,34 nm ; perioada de identitate este de 3,4 nm, deci structura se repetă după 10 baze azotate ;

— stabilitatea dublului helix este asigurată atât de interacțiunile hidrofobe dintre bazele azotate cit și de legăturile de hidrogen ce se stabilesc între bazele azotate de pe o catenă și cele complementare de pe cealaltă catenă.

Legăturile de hidrogen se stabilesc, invariabil, între o bază azotată purinică de pe o catenă și una pirimidinică de pe cealaltă catenă. Împerecherea a două baze purinice este exclusă întrucît s-ar depăși spațiul oferit de dublul helix (diametrul constant, de 2 nm, de-a lungul axului), iar împerecherea a două baze pirimidinice ar face imposibilă stabilirea legăturilor de hidrogen, bazele azotate fiind situate prea departe una de alta. Bazele pereche sînt adenină-timină și guanină-citozină, întrucît numai acestea pot stabili numărul maxim de legături de hidrogen, asigurînd astfel configurația cu energia liberă cea mai mică, deci cea mai stabilă, moleculei de ADN. Adenina se leagă de timină prin două legături de hidrogen, iar guanina de citozină prin trei legături (fig. IV.5). Cele două catene polinucleotidice ale dublului helix

nu sînt identice ci complementare, în sensul că, adeninei dintr-o catenă îi va corespunde întotdeauna timina de pe cealaltă catenă, iar guaninei, citozina. Succesiunea bazelor azotate dintr-o catenă dictează deci succesiunea bazelor azotate din cea de-a doua catenă; o catenă este replica celeilalte. Modelul Watson și Crick este reprezentat în figura IV.4.

Informația genetică cu privire la biosinteza de proteine rezidă în însăși secvența bazelor azotate din catenele de ADN. Multiplele posibilități de variație a acesteia explică multitudinea de proteine ce pot fi sintetizate conform „instrucțiunilor” cuprinse în ADN.

Modelul Watson și Crick oferă elementele pentru explicarea capacității ADN de a stoca și transmite informația genetică de-a lungul generațiilor. În cursul diviziunii celulare o moleculă de ADN parental se separă în două catene ce conțin informația înscrisă în secvența bazelor azotate. Fiecare dintre aceste catene va servi ca matriță (template) pentru sinteza unei catene noi, complementară cu catena parentală, rezultînd astfel două molecule fiice identice cu ADN parental (fig. IV.6).

### IV.3.3. ORGANIZAREA MATERIALULUI GENETIC

#### LA PROCARIOTE ȘI EUCARIOTE

La procariote, o moleculă unică de ADN, de mari dimensiuni (conținînd 4 milioane perechi de baze) și în general circulară (formată prin legarea covalentă a capetelor 5'—3'), alcătuiește un cromozom. Lungimea conturului de ADN cromozomial este de  $\sim 1,4$  nm, deci cu mult mai mare decît dimensiunile unei celule de *Escherichia coli*. Evident, moleculă ADN va trebui să adopte în celulă o formă cît mai compactă, care s-o facă compatibilă cu spațiul oferit de către aceasta. ADN circular formează într-adevăr superhelixuri, sub acțiunea ADN-girazei (fig. IV.7). Trecerea de la forma circulară, relaxată, la cea superhelicoidală presupune aport de energie sub formă de ATP.

Pe lîngă ADN reprezentînd materialul cromozomial, ce cuprinde setul complet de gene pentru specificarea tuturor caracterelor celulei, bacteriile conțin și mici cantități de ADN circular, extracromozomial, care se găsește în citoplasmă. Aceste molecule de ADN se numesc plasmide și conțin o cantitate redusă de informație genetică. Printre alte gene, conțin și gene care specifică anumite proteine ce le conferă rezistență la antibiotice. Evident, administrarea de antibiotice în diverse infecții va trebui să țină seama de sensibilitatea germenilor bacterieni la antibioticul respectiv. Plasmidele pot migra de la o celulă cu rezistență la un antibiotic la altă celulă, cu sensibilitate la antibioticul respectiv, făcînd-o și pe aceasta rezistentă. Rezistența la antibiotice, transferabilă nu numai în cadrul aceleiași specii bacteriene ci și de la o specie la alta, pune probleme serioase antibioterapiei.

Plasmidele s-au dovedit a fi instrumente ideale de manipulare a genelor. Manifestînd autonomie față de ADN cromozomial, plasmidele se autoreplică extrem de rapid. Posibilitatea încorporării unui fragment de ADN străin într-un plasmid, prin tehnicile ingineriei genetice, și reintroducerea plasmidului modificat într-un organism gazdă permite obținerea unor mari cantități din gena străină sau din proteina specificată de aceasta.



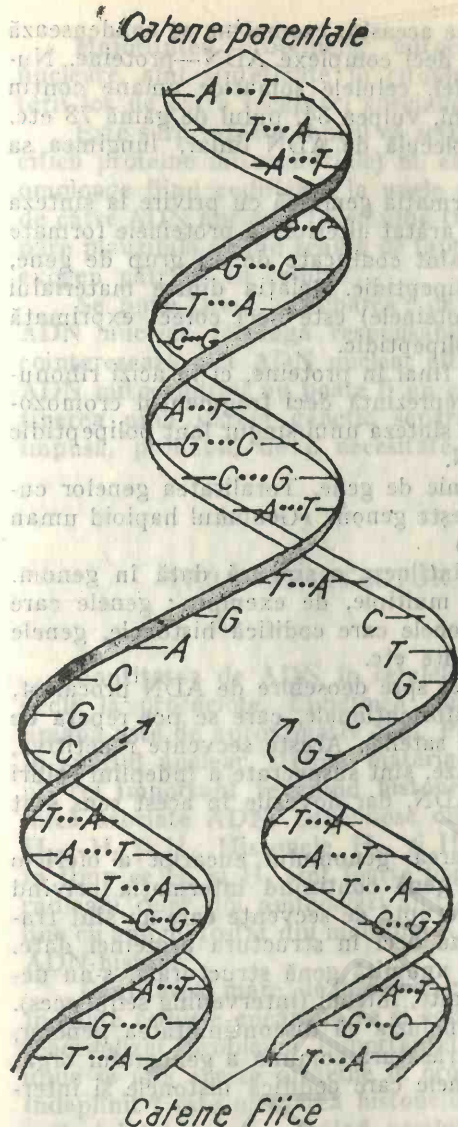


Fig. IV.6 — Autoreplicarea ADN; Fiecare catenă parentală servește ca matrită pentru sinteza unei catene complementare, rezultând două molecule de ADN parental.

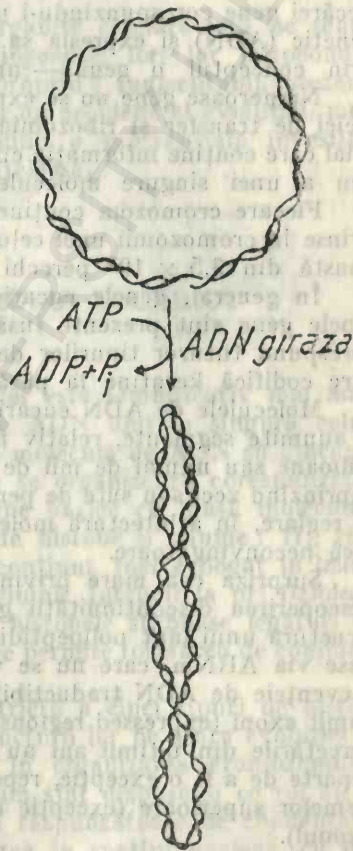


Fig. IV.7 — Organizarea superhelicoidală a ADN la procariote.

În cazul eucariotelor, cea mai mare cantitate de ADN se găsește în nucleu, care, spre deosebire de procariote, este delimitat de citoplasmă printr-o membrană.

În perioadele de repaus ale celulei, deci în afara perioadelor de diviziune, materialul genetic se găsește sub formă de cromatină, un material amorf, dispersat în nucleu, care conține ADN, proteine bazice denumite histone și proteine nehistonice denumite hertone.

În timpul mitozei și puțin înainte de aceasta, cromatina se condensează și se subdivide în cromozomi, care sînt deci complexe ADN—proteine. Numărul acestora depinde de specie; astfel, celulele somatice umane conțin 46 de cromozomi grupați în 23 de perechi, vulpea 34, puilul de găină 78 etc. Fiecare cromozom conține o singură moleculă de ADN liniar, lungimea sa variind de la un cromozom la altul.

Porțiunile de ADN care conțin informația genetică cu privire la sinteza unei proteine au fost denumite gene. S-a arătat ulterior că proteinele formate din mai multe subunități polipeptidice sînt codificate de un grup de gene, fiecărei gene corespunzîndu-i un lanț polipeptidic. Relația dintre materialul genetic (ADN) și expresia sa finală (proteinele) este deci corect exprimată prin conceptul o genă — un lanț polipeptidic.

Numeroase gene nu se exprimă însă final în proteine, ci în acizi ribonucleici de transfer și ribozomiali. Gena reprezintă deci fragmentul cromozomial care conține informația cu privire la sinteza unui singur lanț polipeptidic sau a unei singure molecule de ARN.

Fiecare cromozom conține un set unic de gene. Totalitatea genelor cuprinse în cromozomii unei celule se numește genom. (Genomul haploid uman constă din  $3,5 \times 10^9$  perechi de baze.)

În general, genele eucariotelor se întîlnesc o singură dată în genom. Unele gene sînt prezente însă în copii multiple, de exemplu: genele care corespund tuturor tipurilor de ARN, genele care codifică histonele, genele care codifică keratina la păsări și cornute etc.

Moleculele de ADN eucariot prezintă, spre deosebire de ADN procariot, și anumite segmente, relativ mici, noninformaționale, care se pot repeta de milioane sau numai de mii de ori (ADN satelit). Aceste secvențe repetitive, cuprinzînd zeci sau sute de perechi de baze, sînt suspectate a îndeplini roluri în reglare, în arhitectura moleculei de ADN, dar dovezile în acest sens sînt încă neconvingătoare.

Surpriza cea mare privind organizarea genomului eucariot a oferit-o descoperirea discontinuității genelor. O genă conținînd informația privind structura unui lanț polipeptidic este întreruptă de secvențe care nu sînt traduse via ARNm, care nu se vor exprima deci în structura proteinei date. Secvențele de ADN traductibile, dintr-o anumită genă structurală, s-au denumit exoni (expressed regions), iar celelalte, introși (intervening sequences). Cercetările din ultimii ani au dus la concluzia că discontinuitatea genelor, departe de a fi o excepție, reprezintă o trăsătură comună a genomului organismelor superioare (excepție ar face genele care codifică histonele și interferonul).

Afirmația unor geneticieni după care genomul eucariot este organizat pe linia relaxării și extravaganței nu pare deocamdată extravagantă.

Celulele eucariote conțin, pe lîngă ADN nuclear, și ADN localizat în mitocondrii, diferit, atît prin structură cît și prin unele proprietăți, de cel nuclear. ADN mitocondrial se prezintă ca un duplex circular, cu masă moleculară relativ mică și o capacitate de renaturare surprinzătoare.

Prezența ADN mitocondrial conferă mitocondrii o oarecare autonomie genetică, o parte din proteinele mitocondriale, mai ales cele implicate în biogeneza sa, sintetizîndu-se pe tipar de ADN propriu. Printre aceste proteine semnalăm: NADH-ubichinonoxidoreductaza (inhibată de rotenonă), apocitocromul b, subunități ale citocrom oxidazei, diferite proteine structurale.



Majoritatea proteinelor mitocondriale sînt însă specificate de gene nucleare, sînt sintetizate în citoplasmă și apoi importate, grație recunoașterii lor de către receptori specializați de pe suprafața mitocondriei.

Este surprinzător faptul că setul de gene al ADN mitocondrial (care specifică proteine mitocondriale) nu este identic la diferite organisme, proteine omoloage fiind codificate la unele de către ADN mitocondrial, iar la altele de către ADN nuclear. Ideea unui transfer de gene între nucleu și mitocondrie pare plauzibilă ținînd seama de faptul că ADN nuclear poate încorpora ADN exogen pătruns în celulă.

Se pune firesc întrebarea: de ce alte organite celulare lasă pe seama ADN nuclear întreaga responsabilitate a biogenezei lor, iar mitocondria cointereesează atât ADN nuclear cit și ADN propriu? Indiscutabil, prezența ADN mitocondrial nu poate fi un capriciu sau un accident al evoluției, menținerea unui sistem genetic separat constituind o substanțială investiție, impusă, probabil, de o necesitate încă neînțeleasă.

#### IV.3.4. ARHITECTURA GENOMULUI EUCARIOT

Cantitatea de ADN în celulele eucariotelor este semnificativ mai mare decît la procariote. Lungimea conturului de ADN dintr-o singură celulă umană este de aproximativ 2 m. Pentru ca o moleculă de ADN să „încapă” în spațiul nuclear, strîmt, materialul genetic se organizează corespunzător, un rol important revenind histonelor, proteine bazice cu masă moleculară mică asociate ADN. Se cunosc cinci clase de histone și anume:  $H_1$ ,  $H_{2A}$ ,  $H_{2B}$ ,  $H_3$  și  $H_4$ . Histonele  $H_{2A}$  și  $H_{2B}$  au un conținut foarte bogat în lizină, în timp ce  $H_3$  și  $H_4$  sînt foarte bogate în arginină. Întrucît la pH fiziologic radicalii celor doi aminoacizi sînt protonați, histonele stabilesc legături salinice cu anionii fosfat din molecula ADN, ceea ce permite formarea de complexe ADN-histone.

Cantitatea mare de histone, existența strictă a cinci tipuri de histone în toate celulele eucariote ca și constanța structurii lor pe scara evoluției au reactualizat problema importanței acestora în organizarea cromozomilor: unde se află aceste proteine în cromozom, cum sînt dispuse și ce rol au de îndeplinit? este asocierea histonelor cu ADN răspunzătoare de condensarea materialului genetic, făcînd posibilă încadrarea în spațiul nuclear, cu diametrul de  $1/10$  nm., a unor molecule care, extinse, ar măsura 2 m?

Cercetările ultimei decade, utilizînd un întreg arsenal de tehnici de performanță (microscopie electronică, difracție neutrionică etc.) au dus la concluzii ce par să dezlege „misterul” histonelor.

Studiile de difracție a razelor X (efectuate de Wilkins și Buzzati) au dus la constatarea surprinzătoare că cromatina (cromozomii interfazici) prezintă structuri repetabile la intervale de  $\sim 10$  nm.

În studiile de microscopie electronică cromatina are aspectul unor mărgeli pe ață. „Mărgelile” reprezintă o suită de particule sferice cu diametrul de  $\sim 10$  nm, iar „ața”, porțiuni de ADN liber. Unitatea repetitivă de 10 nm, evidențiată prin studiile de microscopie electronică, a fost denumită nucleo-

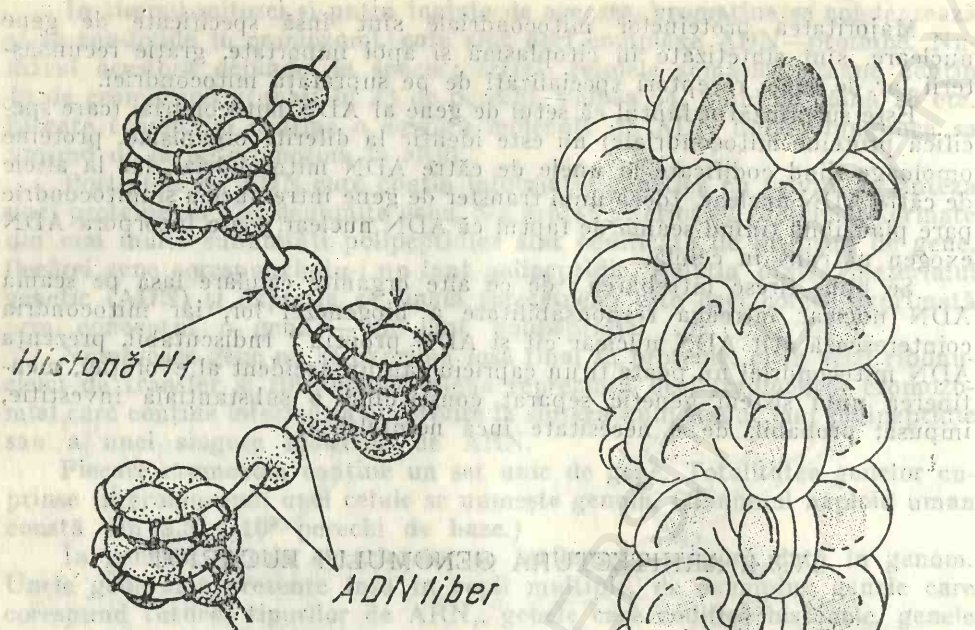


Fig. IV.8 — Nucleozomi reuiniți prin ADN liber.

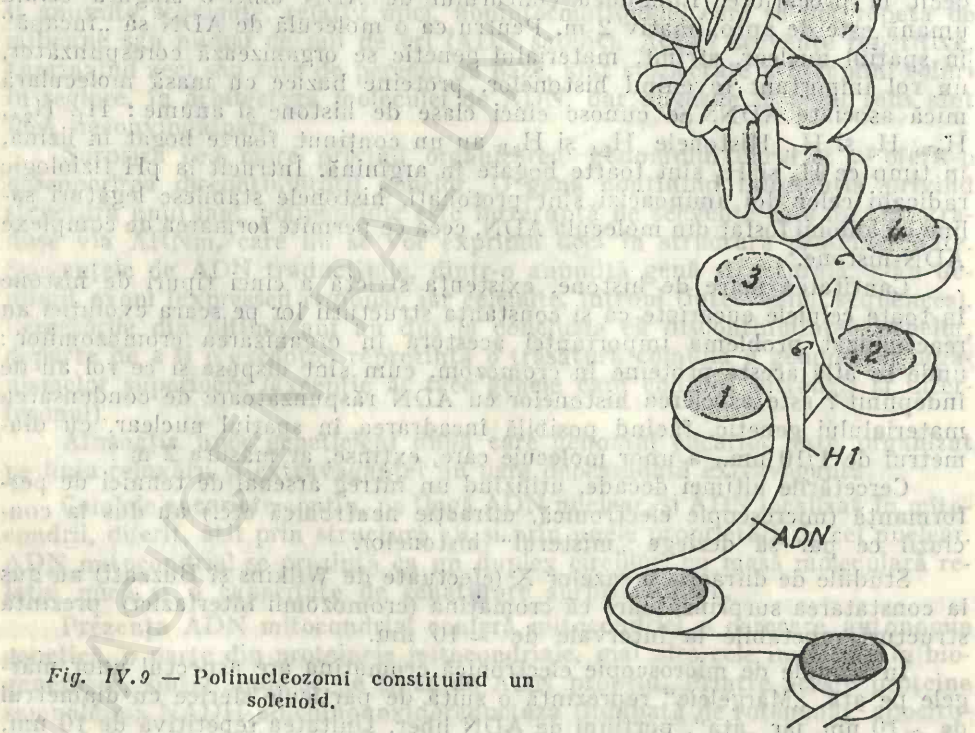


Fig. IV.9 — Polinucleozomi constituind un solenoid.



zom. Fiecare unitate repetitivă — nucleozom — cuprinde un octamer histonic constituit din  $2H_{2A}$ ,  $2H_{2B}$ ,  $2H_3$ ,  $2H_4$ , ce formează un fel de cilindru turtit cu dimensiunile  $11 \times 11 \times 5,5$  nm. Dubla elice a ADN înfășoară de  $\sim 2$  ori fiecare miez histonic al nucleozomului. ADN asociat octamerului este constituit din aproximativ 140 perechi de baze: 20—60 perechi de baze sint asociate, probabil, histonei  $H_1$ , care nu intră în miezul octameric al nucleozomului. Între doi nucleozomi adiacenți se găsește ADN liber, la care este legată histona  $H_1$  (Fig. IV.8).

Studiile de difracție neutronică au demonstrat că ADN împachetează octamerul histonic și nu invers, cum se credea, astfel încît polinucleozomii pot fi mai degrabă asimilați cu o ață înfășurată pe mărgele.

În cromatina eucariotelor nucleozomii formează un superhelix, dispunându-se după un solenoid cu un pas de 10 nm, cu diametrul de 30 nm și o distanță între spire de 10 nm (fig. IV.9). Fiecare tur de spirală are 6—10 nucleozomi. Histona  $H_1$  ar juca un rol în acest proces de superspiralizare a nucleozomului, legându-se de ADN internucleozomic. Solenoizii ar fi, ei înșiși, organizați în fibre cu configurații helicale de ordin superior.

Se pare că însăși cromatina „activă”, subiect al replicării și transcrierii, este asociată cu histonele. Cromatina activă ar conține, pe lângă histone, și proteine nehistonice care modifică, într-o oarecare măsură, structura nucleozomului ce „se deschide”, permițind citirea mesajului genetic. Structura condensată trece într-o stare mai destinsă, care permite replicarea și transcrierea.

Indiscutabil, imaginea pe care o avem despre cromatină, și mai ales despre modificările pe care aceasta le poate suferi, este încă incompletă și perfectibilă.

#### IV.3.5. BIOSINTEZA ADN

Biosinteza ADN trebuie să decurgă astfel încît să permită conservarea și transmiterea informației genetice de la o generație la alta. În cursul diviziunii celulare, fiecare celulă generează două celule fiice cu același patrimoniu genetic, conținând deci, aceeași cantitate și calitate de ADN.

Modalitatea specifică de biosinteză a ADN este replicarea, respectiv desfacerea duplexului ADN parental și construirea pe fiecare dintre cele două catene a cîte unei catene complementare — replica celor dintii. Ca urmare a replicării apar două molecule ADN fiice identice cu parentală, în fiecare dintre moleculele nou formate conservindu-se o catenă veche, parentală. Sinteza ADN poartă din acest motiv numele de replicare semi-conservativă (fig. IV.6).

Intuită de către Watson și Crick, replicarea semiconservativă a fost confirmată de Meselson și Stahl. Cultivînd o bacterie (*Escherichia coli*) într-un mediu conținînd ca unică sursă de azot  $NH_4Cl$  marcată cu  $^{15}N$ , se obține ADN bacterian integral marcat. Bacteriile sint transferate apoi pe un mediu conținînd  $NH_4Cl$  nemarcată. ADN extras după prima diviziune are o densitate intermediară între aceea a ADN marcat cu  $^{15}N$  (greu) și aceea a ADN nemarcat (ușor). După cea de a doua diviziune, pe lângă ADN cu densitate intermediară (50% din ADN total), apare, în aceeași proporție, ADN ușor (fig. IV.10). Desigur, în următoarele generații bacteriene procentul pe ADN ușor va crește.

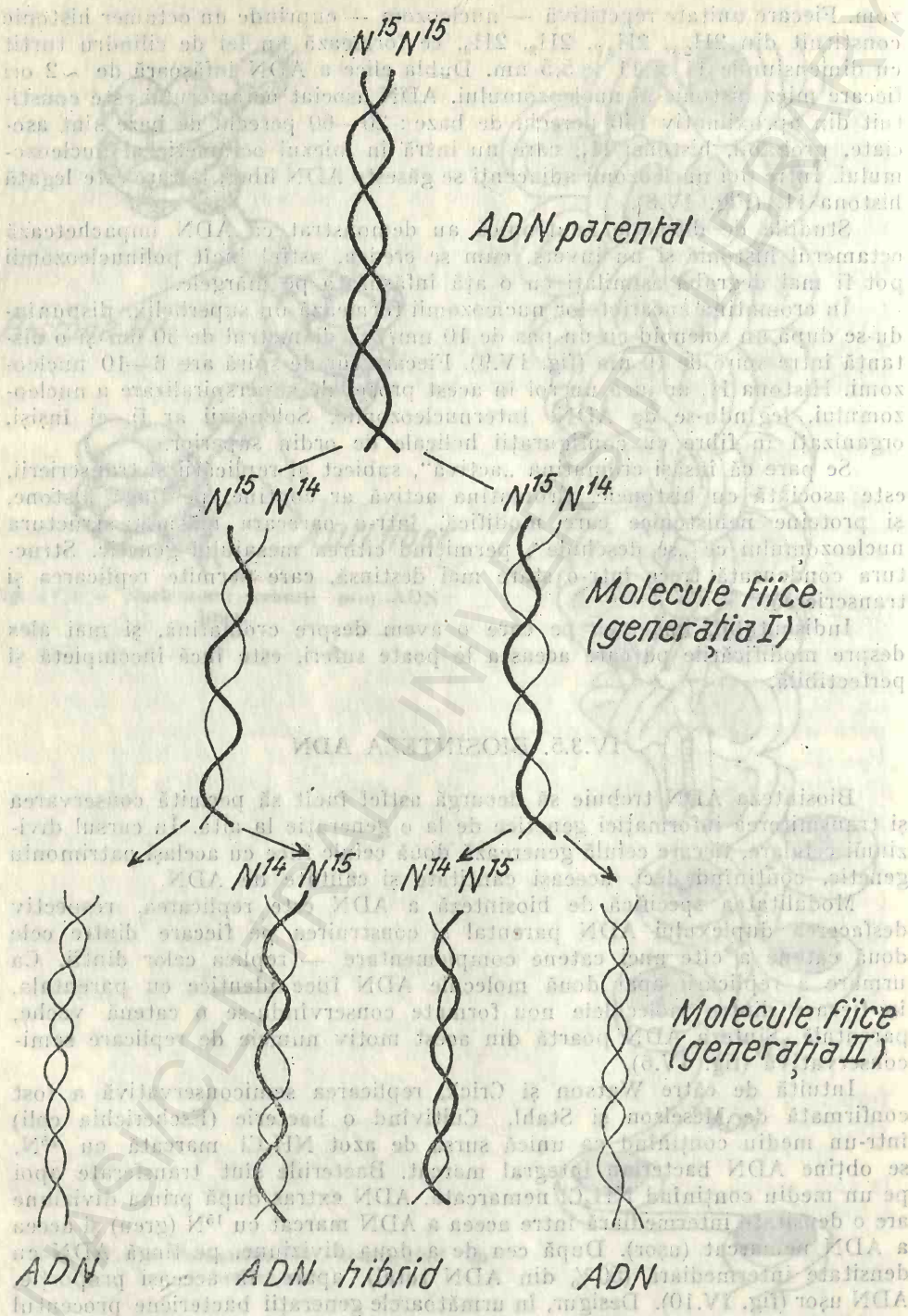


Fig. IV.10 — Replicarea semiconservativă; experiența Meselson-Stahl.



Experiența, devenită clasică, a lui Meselson și Stahl a reprezentat dovada de necontestat a mecanismului de replicare a ADN. Considerată ca mecanism general de sinteză (in vivo) a ADN la procariote și eucariote, sinteza semiconservativă asigură transferul de informație genetică de la ADN parental la ADN fiu și deci menținerea stabilității genetice a fiecărui organism și a speciei.

Procesul de biosinteză a ADN este un proces de mare complexitate, care necesită:

- prezența ADN matriță (template);
- prezența celor patru dezoxiribonucleozid-trifosfați (dATP, dGTP, dCTP, dTTP);

— prezența ribonucleozid trifosfaților (ATP, GTP, UTP, CTP), sugerînd necesitatea sintezei de ARN în cursul sintezei ADN;

- prezența ionilor de magneziu;

— un sistem multienzimatic avînd ca enzime constitutive:

a) helicaza — enzimă care realizează desfacerea duplexului parental în cele două catene complementare, permițînd citirea secvenței nucleotidelor de către enzimele replicării. Desfacerea duplexului parental se realizează treptat, pe porțiuni mici de ADN, pe măsură ce replicarea avansează. Cele două catene rămîn separate ca urmare a intervenției proteinelor de stabilizare a ADN monocatenar care se leagă ferm la acesta. În desfacerea duplexului parental un rol important revine topoizomerazei.

b) ADN primaza, enzimă care sintetizează mici fragmente de ARN (ARN inițiator, primer), necesare inițierii sintezei de ADN.

c) ADN polimeraza, ADN dependentă, catalizează formarea de catene polidezoxiribonucleotidice și are următoarele atribute:

— edifică lanțuri polidezoxiribonucleotidice preluînd instrucțiuni de la o matriță de ADN, care dictează secvența nucleotidelor în catena nou sintetizată;

- nu inițiază catene ADN;

— sintetizează exclusiv catene cu direcția  $5' \rightarrow 3'$ ;

— prezintă, pe lîngă activitate polimerazică, și activitate exonucleazică, excizînd nucleotide de la capătul  $5'$  sau  $3'$  al catenei.

La procariote s-au descris mai multe ADN polimeraze (I, II, III), avînd funcții specifice.

Rolul central în procesul de replicare in vivo revine ADN polimerazei III, enzimă cu masă moleculară mare ( $\sim 500\,000$ ) constituită din mai multe subunități, fiecare avînd un rol precis în legarea substratelor (ADN matriță, ARN primer, d NTP), acțiunea polimerazică și cea exonucleazică.

Atributele enumerate permit ADN polimerazei III să exercite, pe lîngă activitate polimerazică, și o importantă activitate de control a replicării, asigurînd o înaltă fidelitate procesului.

ADN polimerazei I îi revin sarcini speciale în evenimentele replicării, așa cum se va arăta ulterior.

d) ADN ligaza — enzimă ce reunește fragmentele de ADN rezultate în cursul replicării. ADN-ligaza catalizează formarea unei legături fosfatdiesterice între extremitatea  $3'$ -OH a unui fragment de ADN și extremitatea  $5'$  monofosfat a altuia. Enzima necesită prezența unui donor al unui rest de acid adenilic (ATP la eucariote, NAD la procariote) care se fixează la capătul  $5'$  monofosfat al unui fragment, generînd o structură de tipul  $-O-P-P-Riboză-$

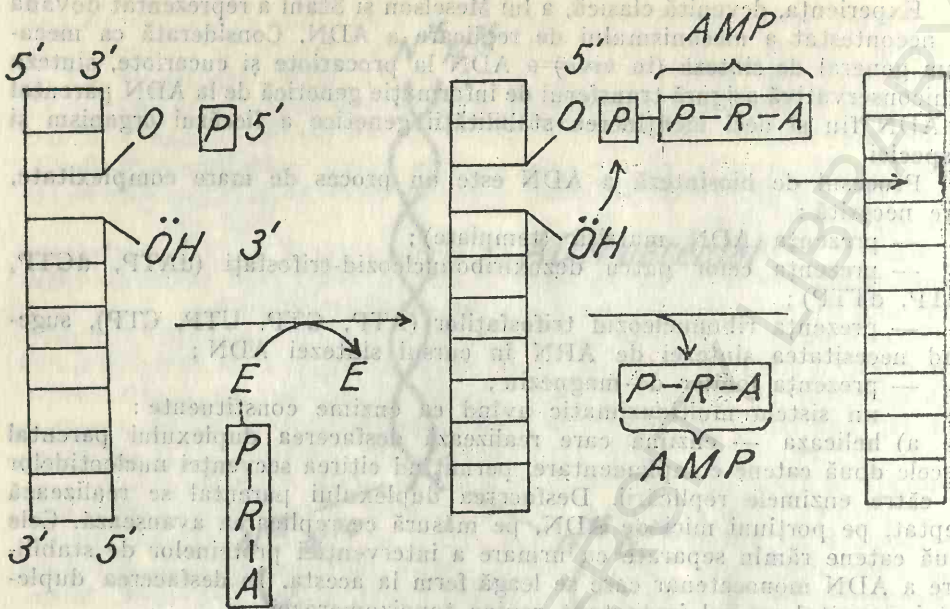


Fig. IV.11 — Mecanismul de acțiune a ADN-ligazei.

Adenină. Capătul 3'OH terminal al celui alt fragment atacă legătura —P—P— și, eliberând AMP, stabilește o legătură fosfat diesterică care reunește cele două fragmente de ADN (Fig. IV.11).

Complexul de factori care participă la replicarea ADN poartă numele de replizom sau sistemul ADN replicază.

#### IV.3.5.1. Replicarea la procariote

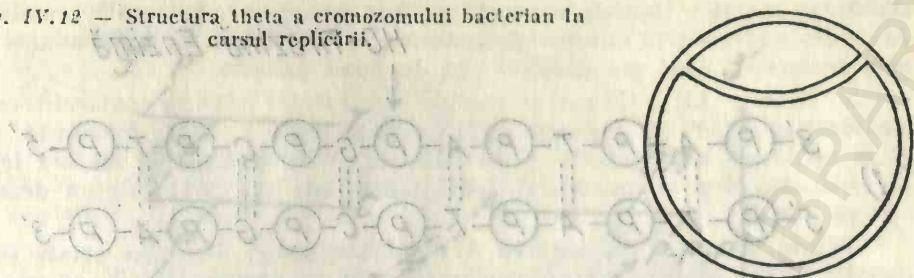
Desfășurarea procesului de biosinteză a ADN la procariote implică următoarea succesiune de evenimente:

1. Inițierea replicării se produce în puncte bine determinate, având caracteristici distinctive, ușor de recunoscut de către enzimele inițierii (helicaze, topoizomeraze, ADN primaze), denumite „regiuni origine” (ori). La *Escherichia coli* ar exista o singură „regiune ori”. Duplexul de ADN circular se replică simultan în ambele direcții; cromozomul bacterian are, în timpul replicării, forma literei theta: (Fig. IV.12).

Regiunea activă în replicare la un moment dat și care se deplasează de-a lungul duplexului parental este desemnată drept „bifurcație de replicare”. Pe cromozomul bacterian evoluează două bifurcații de replicare, una în sens orar, cealaltă în sens antiorar.



Fig. IV.12 — Structura theta a cromozomului bacterian în cursul replicării.



Inițierea replicării parcurge două etape :

a) desfacerea duplexului parental pe anumite porțiuni — replicatori — sub acțiunea helicazelor ; procesul, presupunând ruperea legăturilor de hidrogen dintre bazele complementare, se produce cu un substanțial consum de energie (ATP). Desfacerea duplexului parental, realizată inițial pe o porțiune mică de ADN („în regiunea ori“), continuă de-a lungul moleculei pe măsura înaintării bifurcației de replicare, care este precedată de helicaze. Reunirea catenelor de ADN formate este prevenită de către proteinele de stabilizare a ADN monocatenar. Desfacerea duplexului ADN permite accesul replizomului la fiecare dintre catenele ADN parental, ce vor constitui matrițe pentru sinteza a cîte unei catene fiice.

Intrucît duplexul circular se desface (se desrăsuște), în regiunea bifurcației de replicare, cu o viteză de aproximativ 100 de revoluții/secundă, apar inevitabil supertorsiuni, regiuni superhelicale, dincolo de limita bifurcației de replicare. Într-o moleculă circulară, avansarea bifurcației de replicare generează supertorsiuni pozitive, care pot bloca replicarea. Am văzut că ADN-giraza (topoizomeraza II) introduce în molecula ADN supertorsiuni negative, astfel încît constrîngerile impuse de avansarea bifurcației de replicare sînt în mare măsură contraccarale și replicarea nu este stînjinită. Interesant de notat că acidul nalidixic (Negram), inhibitor al ADN girazei, suprimă creșterea și multiplicarea bacteriană.

Torsiunile pozitive pot fi eliminate și prin acțiunea topoizomerazei de tip I. ADN topoizomeraza acționează ca o endonuclează reversibilă. Ea incizează o legătură fosfat diesterică de pe una dintre catenele ADN, permițînd astfel celor două capete ale ADN să se rotească unul față de celălalt ; starea superhelicală este desființată. Acțiunea de „suveică“ a topoizomerazei I duce la relaxarea termodinamic avantajoasă a ADN. Este necesară, desigur, refacerea legăturii fosfat diesterice incizate. Intrucît energia legăturii fosfat diesterice originale a fost conservată într-o legătură fosfat-esterică, implicînd tirozina din centrul activ al enzimei, reacția este reversibilă și nu necesită aport energetic (Fig. IV.13).

b) Construirea unei molecule de ARN inițiator (sau primer) al polimerizării dezoxiribonucleozid trifosfaților în „regiunea ori“. Primerul este reprezentat de un ARN de mici dimensiuni (5—10 ribonucleotide) și este realizat prin acțiunea ADN primazei.

2. Elongarea, alungirea ARN inițiator, constă în adăugarea succesivă de dezoxiribonucleozidfosfați la capătul 3' al acestuia. Reacția decurge prin atacul nucleofil al grupeii OH de la capătul 3' al moleculei primer asupra unui

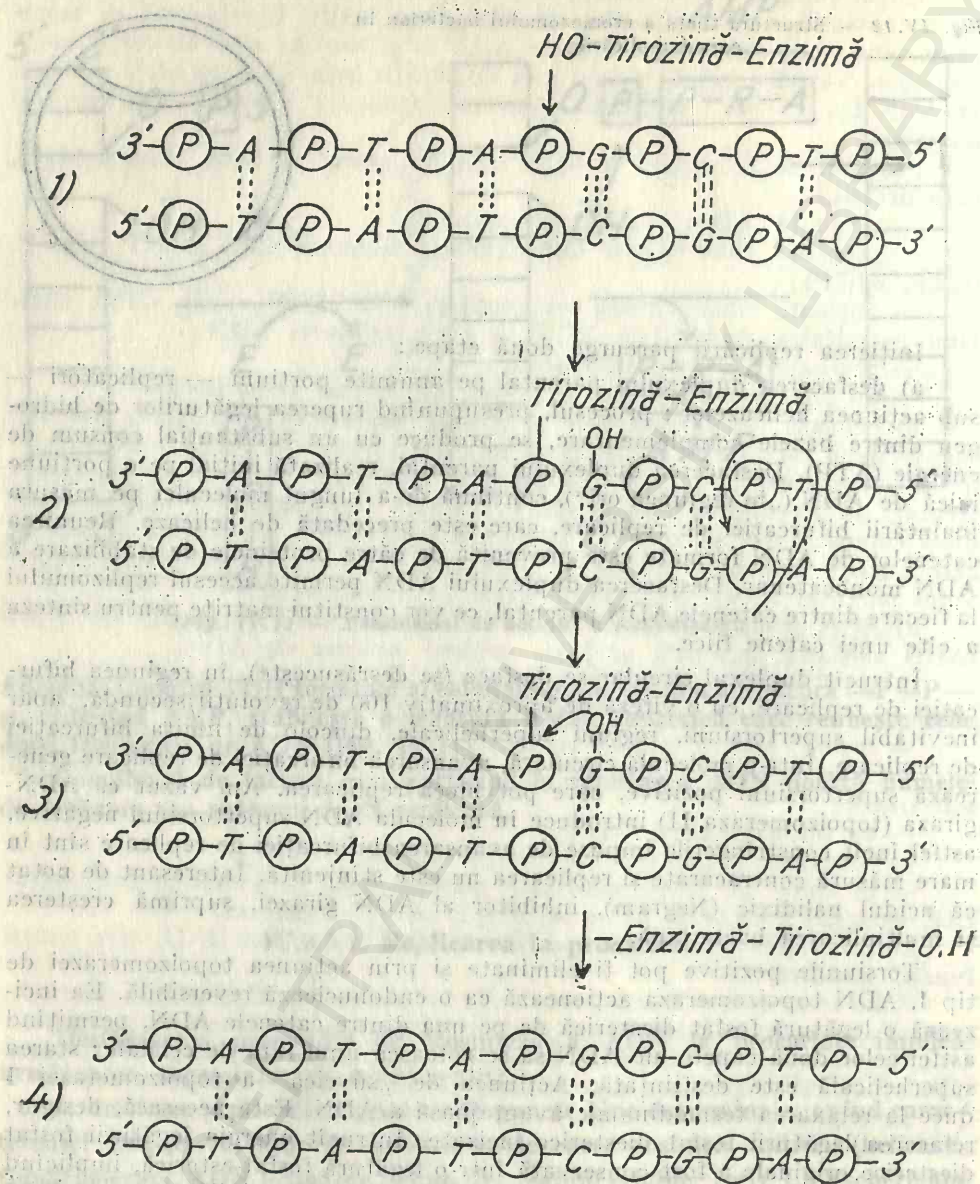


Fig. IV.13 — Reacția catalizată de ADN topoizomeraza I, 1,2,-incizia legăturii fosfat diesterice și rotația reciprocă a fragmentelor de ADN; 3,4- refacerea legăturii fosfat diesterice.

dezoxiribonucleozid trifosfat aliniat în ordinea dictată de matrită (ADN monocatenar), cu care formează legături de hidrogen (Fig. IV.14). Reacția are loc sub acțiunea ADN polimerazei III și duce la formarea unei legături fosfat diesterice ce inițiază propriu-zis catena ADN fiică. Energia necesară formării legăturii fosfat diesterice este furnizată de clivarea restului pirofosfat a cărei scindare ulterioară, sub acțiunea pirofosfatazei, asigură irever-



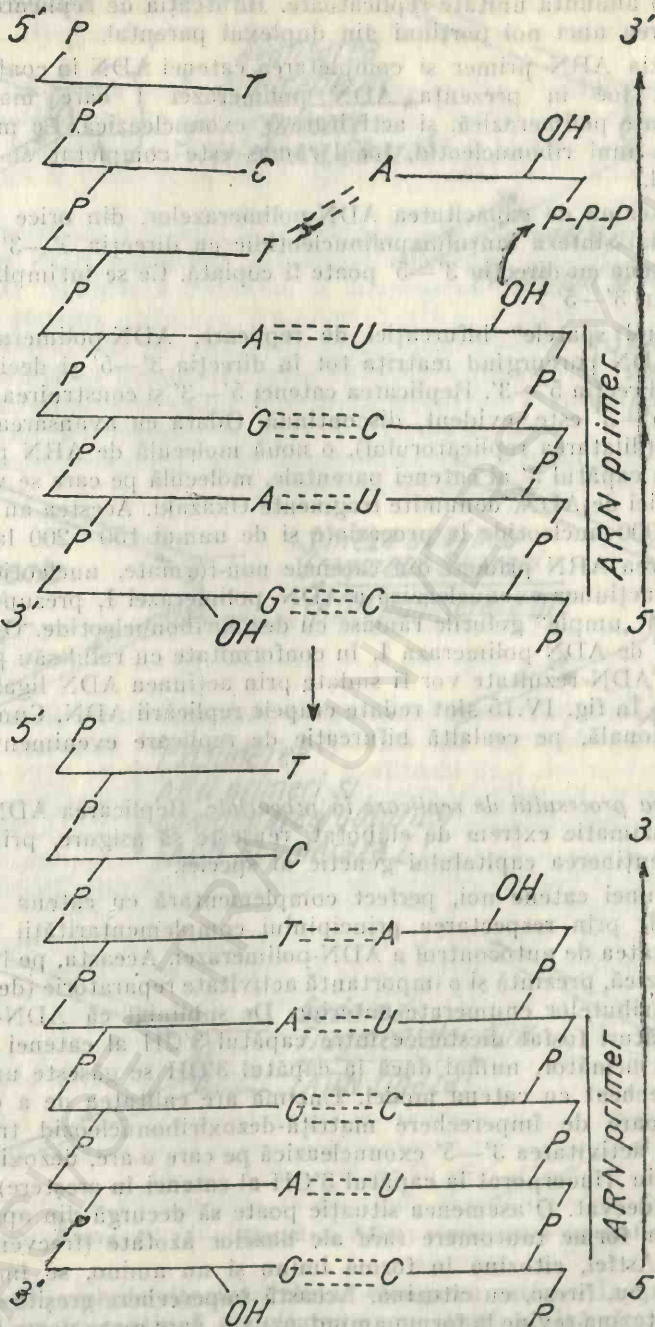


Fig. IV.14 — Elongarea primerului la capătul 3' OH.

sibilitatea reacției. Reacția se repetă pînă la parcurgerea integrală a matriței ADN dintr-o anumită unitate replicatoare. Bifurcația de replicare avansează prin desfacerea unei noi porțiuni din duplexul parental.

3. Excizia ARN primer și completarea catenei ADN în conformitate cu matrița are loc în prezența ADN polimerazei I care manifestă, pe lîngă activitate polimerazică, și activitate 5' exonucleazică. Pe măsura îndepărtării cîte unui ribonucleotid, locul rămas este completat cu un dezoxiribonucleotid.

Ținînd seama de capacitatea ADN-polimerazelor, din orice sursă, de a cataliza numai sinteza lanțului polinucleotidic cu direcția 5'—3', ar rezulta că numai catena cu direcția 3'—5' poate fi copiată. Ce se întîmplă cu catena avînd direcția 3'—5'?

„Întorcînd spatele“ bifurcației de replicare, ADN-polimeraza va face sinteză de ADN parcurgînd matrița tot în direcția 3'—5' și deci construind o replică cu direcția 5'—3'. Replicarea catenei 5'—3' și construirea unei replici cu direcția 5'—3' este, evident, discontinuă. Odată cu avansarea bifurcației de replicare (dilatarea replicatorului), o nouă moleculă de ARN primer va fi sintetizată la capătul 3' al catenei parentale, moleculă pe care se vor construi fragmente mici de ADN, denumite fragmente Okazaki. Acestea au dimensiuni de 1 000—2 000 nucleotide la procariote și de numai 150—200 la eucariote.

Excluderea ARN primeri din catenele nou-formate, nucleotid după nucleotid, prin acțiunea exonucleazică a ADN polimerazei I, presupune obligativitatea de a „umple“ golurile rămase cu dezoxiribonucleotide. Operația este efectuată tot de ADN polimeraza I, în conformitate cu rolul său polimerazic. Fragmentele ADN rezultate vor fi sudate prin acțiunea ADN ligazei, cu consum de ATP. În fig. IV.15 sînt redată etapele replicării ADN. Cum replicarea este bidirecțională, pe cealaltă bifurcație de replicare evenimentele decurg identic.

*Fidelitatea procesului de replicare la procariote.* Replicarea ADN, utilizînd un aparat enzimatic extrem de elaborat, reușește să asigure, prin înalta sa fidelitate, menținerea capitalului genetic al speciei.

Crearea unei catene noi, perfect complementară cu catena matriță, se realizează atît prin respectarea principiului complementarității bazelor cît și prin activitatea de autocontrol a ADN-polimerazei. Aceasta, pe lîngă activitate polimerazică, prezintă și o importantă activitate reparatorie (de corectare), rezultat al atributelor enumerate anterior. De subliniat că ADN-polimeraza stabilește legături fosfat diesterice între capătul 3'OH al catenei în creștere și nucleotidul următor, numai dacă la capătul 3'OH se găsește un nucleotid corect împerecheat cu catena model. Enzima are calitatea de a descoperi o eventuală eroare de împerechere matriță-dezoxiribonucleozid trifosfat, de a exciza, prin activitatea 3'—5' exonucleazică pe care o are, dezoxiribonucleotidul impropriu (incorporat la capătul 3'OH al catenei în creștere) și de a selecta pe cel adecvat. O asemenea situație poate să decurgă din apariția tranzitorie a unor forme tautomere rare ale bazelor azotate (frecvența este de  $10^{-4}$ — $10^{-5}$ ). Astfel, citozina în formă imino și nu amino, se împerechează cu adenina și nu, firește, cu citozina. Această împerechere greșită este numai temporară, citozina revine la forma amino, uzuală, care nu se poate împerechea cu adenina; situația este sesizată de ADN polimerază care nu mai continuă elongarea catenei cu capătul 3'OH neîmperecheat. Prin activitatea exonucle-



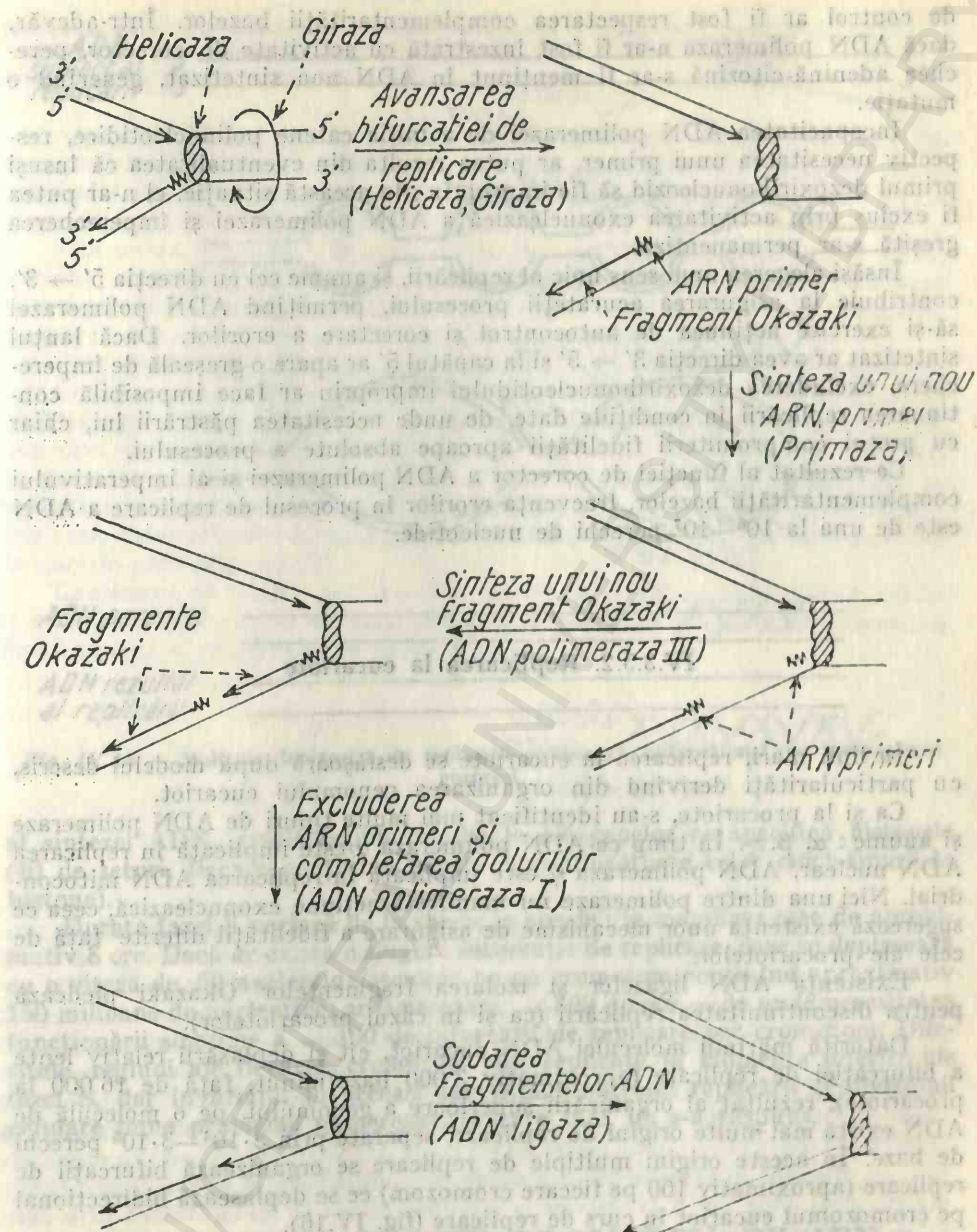


Fig. IV/15 Biosinteza ADN; reprezentare schematică.

azică 3'—5' exclude citozina, reluind elongarea catenei. În ipoteza unor erori repetate, ea își continuă activitatea exonucleazică până când găsește capătul 3'OH adecvat (împerecheat cu matrița). Această activitate de supercontrol a ADN polimerazei elimină erori care s-ar fi comis dacă singurul mecanism

de control ar fi fost respectarea complementarității bazelor. Într-adevăr, dacă ADN polimeraza n-ar fi fost înzestrată cu activitate de corector, perechea adenină-citozină s-ar fi menținut în ADN nou sintetizat, generând o mutație.

Incapacitatea ADN polimerazei de a iniția catene polinucleotidice, respectiv necesitatea unui primer, ar putea rezulta din eventualitatea că însuși primul dezoxiribonucleozid să fie impropriu; în această situație, el n-ar putea fi exclus prin activitatea exonucleazică a ADN polimerazei și împerecherea greșită s-ar permanentiza.

Însăși alegerea unui sens unic al replicării, și anume cel cu direcția  $5' \rightarrow 3'$ , contribuie la asigurarea acuratelii procesului, permițând ADN polimerazei să-și exercite acțiunea de autocontrol și corectare a erorilor. Dacă lanțul sintetizat ar avea direcția  $3' \rightarrow 5'$  și la capătul  $5'$  ar apare o greșală de împerechere, excluderea dezoxiribonucleotidului impropriu ar face imposibilă continuarea replicării în condițiile date, de unde necesitatea păstrării lui, chiar cu prețul compromiterii fidelității aproape absolute a procesului.

Ca rezultat al funcției de corector a ADN polimerazei și al imperativului complementarității bazelor, frecvența erorilor în procesul de replicare a ADN este de una la  $10^6$ — $10^7$  perechi de nucleotide.

#### IV.3.5.2. Replicarea la eucariote

În linii mari, replicarea la eucariote se desfășoară după modelul descris, cu particularități derivând din organizarea genomului eucariot.

Ca și la procariote, s-au identificat mai multe tipuri de ADN polimeraze și anume:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . În timp ce ADN polimeraza  $\alpha$  este implicată în replicarea ADN nuclear, ADN polimeraza  $\gamma$  este implicată în replicarea ADN mitocondrial. Nici una dintre polimeraze nu manifestă acțiune exonucleazică, ceea ce sugerează existența unor mecanisme de asigurare a fidelității diferite față de cele ale procariotelor.

Existența ADN ligazelor și izolarea fragmentelor Okazaki pledează pentru discontinuitatea replicării (ca și în cazul procariotelor).

Datorită mărimii moleculei ADN eucariot, cât și deplasării relativ lente a bifurcației de replicare (aproximativ 3 000 baze/minut, față de 16 000 la procariote), rezultat al organizării superioare a genomului, pe o moleculă de ADN există mai multe origini de replicare, separate prin  $3 \cdot 10^4$ — $3 \cdot 10^5$  perechi de baze. În aceste origini multiple de replicare se organizează bifurcații de replicare (aproximativ 100 pe fiecare cromozom) ce se deplasează bidirecțional pe cromozomul eucariot în curs de replicare (fig. IV.16).

Fidelitatea replicării este la eucariote de ordinul  $10^{-9}$ , rezultat, probabil, al însăși naturii cromozomului eucariot și al acțiunii unor exonucleaze  $3' \rightarrow 5'$  care secondează ADN polimeraza.

Biosinteza ADN are loc la mamifere în faza S, de sinteză, a ciclului celular, fază separată de faza mitotică prin perioadele de gol sintetic,  $G_1$  și  $G_2$ . În cursul acestei faze, ADN nuclear este replicat în întregime și o singură dată. Cantitatea de ADN și histone se dublează. Ritmul sintezei de histone este cel



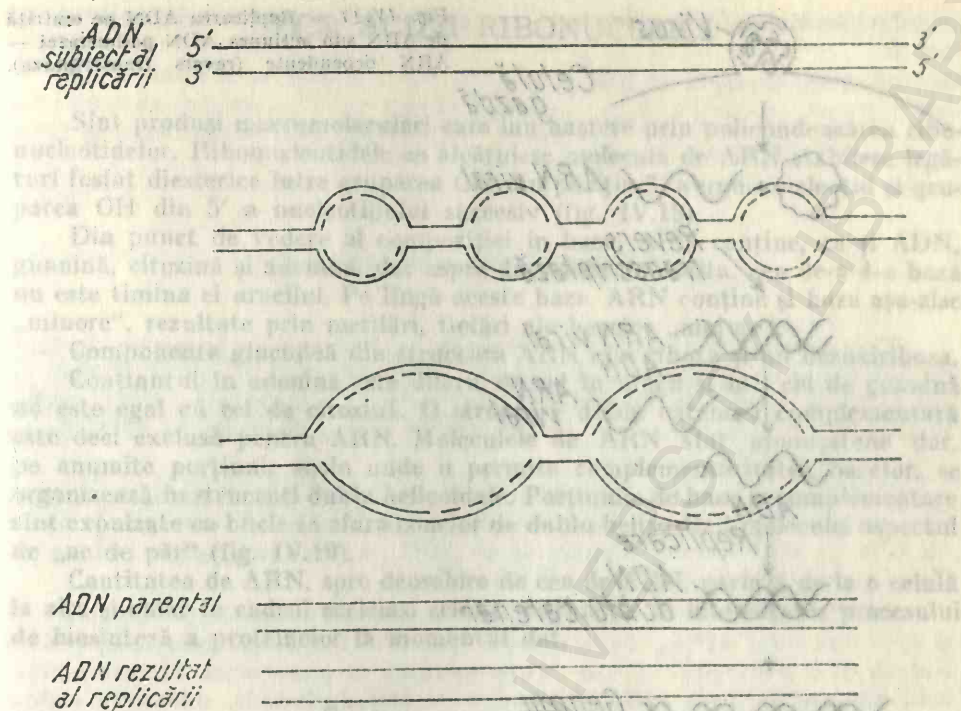


Fig. IV.16 — Multiple bifurcații de replicare avansează bidirecțional pe cromozomul eucariot.

al sintezei ADN, grație copiilor multiple ale genelor ce specifică histonele (40 de seturi, fiecare conținând genele corespunzătoare celor cinci tipuri de histone).

Durata fazei S variază de la specie la specie; la mamifere este de aproximativ 8 ore. Dacă ar exista o singură bifurcație de replicare, care se deplasează cu o viteză de 50 nucleotide/secundă pe un cromozom conținând aproximativ 150 milioane de nucleotide, ar fi necesare ~ 800 de ore — de unde necesitatea funcționării sincrone a ~ 100 de bifurcații de replicare per cromozom. Diferitele regiuni ale fiecărui cromozom sunt replicate în momente diferite ale fazei S, dar invariabil în aceeași secvență. Controlul replicării și diviziunii celulare pune probleme numeroase, la care încă nu s-a răspuns.

#### IV.4. SINTEZA DE ADN PE MATRIȚĂ DE ARN

Fluxul de informație genetică în lumea vie are, în general, sensul ADN → ARN → proteine. În ultimii ani, s-a identificat în virusurile oncogene conținând ca material genetic ARN o enzimă a cărei existență era greu de prevăzut și care a completat conceptul exprimat prin „dogma centrală” a geneticii moleculare. Această enzimă, revers transcriptază, este o ADN polimerază-

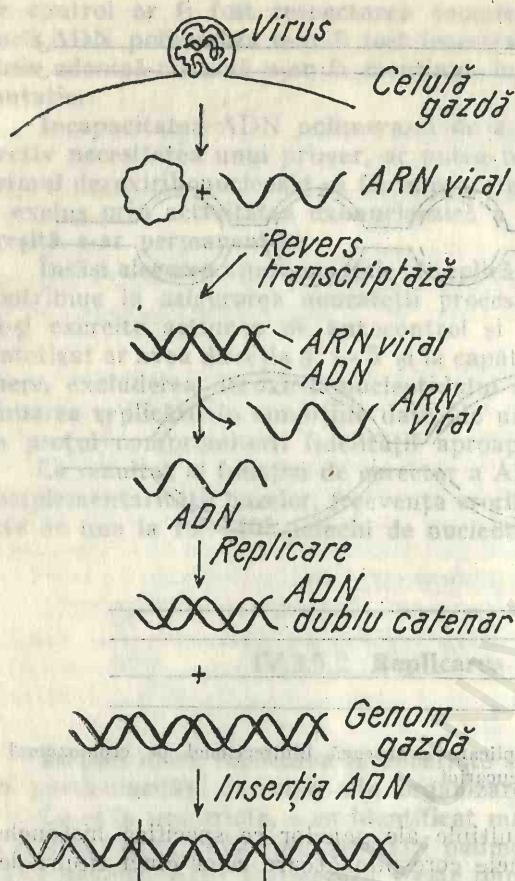


Fig. IV.17 — Replicarea ADN pe matriță de ARN sub acțiunea ADN polimerazei — ARN dependente (revers transcriptază).

ARN dependentă. Ea are abilitatea ca, odată pătrunsă în celula gazdă, să sintetizeze un hibrid ADN-ARN, mai exact, să construiască o catenă de ADN pe matriță de ARN. ARN viral este degradat enzimatic iar catena ADN rămasă se autoreplică, dînd naștere la un duplex ADN ce conține informația prezentă în ARN viral (fig. IV.17). Acesta se inseră în genomul gazdă, pîlîndu-se exprima ca proteine, într-o anumită conjunctură. Cum numeroase virusuri ARN sînt oncogene și genomul viral este moștenit, se consideră că fiecare subiect uman este purtătorul unor gene oncogene neexprimate, ca rezultat al pătrunderii unor astfel de virusuri ARN (retrovirusuri) în organism într-un moment al evoluției. Dacă apare o condiție care să le favorizeze exprimarea, deci dacă vor fi transcrise și traduse, celula se malignizează prin acțiunea unor proteine ce realizează transformarea neoplazică (adesea kinaze).

Descoperirea revers transcriptazei, pe lîngă semnificația ei teoretică, are și o importantă latură practică rezultată din faptul că, deși preferă propriul ARN (viral), enzima poate utiliza ca matriță orice ARN pe care construiește un ADN complementar (ADNc). Apare, astfel posibilitatea obținerii unor gene sintetice (ADNc), prin utilizarea unor ARN mesageri, relativ ușor de izolat, gene care prin tehnicile ingineriei genetice pot produce mari cantități din proteina codificată.



## IV.5. ACIZII RIBONUCLEICI

Sînt produși macromoleculari care iau naștere prin policondensarea ribonucleotidelor. Ribonucleotidele ce alcătuiesc molecula de ARN stabilesc legături fosfat diesterice între gruparea OH din poziția 3' a unui nucleotid și gruparea OH din 5' a nucleotidului succesiv (fig. IV.18).

Din punct de vedere al compoziției în baze, ARN conține, ca și ADN, guanină, citozină și adenină, dar aspre deosebire de acesta, cea de-a 4-a bază nu este timina ci uracilul. Pe lîngă aceste baze, ARN conține și baze așa-zise „minore“, rezultate prin metilări, tiolări ale bazelor „majore“.

Componența glucidică din structura ARN este riboza și nu dezoxiriboza. Conținutul în adenină este diferit de cel în uracil și nici cel de guanină nu este egal cu cel de citozină. O structură dublu catenară complementară este deci exclusă pentru ARN. Moleculele de ARN sînt monocatene dar, pe anumite porțiuni, acolo unde o permite complementaritatea bazelor, se organizează în structuri dublu helicoidale. Porțiunile de baze necomplementare sînt expulzate ca bucle în afara zonelor de dublu helix, dînd moleculei aspectul de „ac de păr“ (fig. IV.19).

Cantitatea de ARN, spre deosebire de cea de ADN, variază de la o celulă la alta și chiar în cadrul aceleiași celule, în funcție de intensitatea procesului de biosinteză a proteinelor la momentul dat.

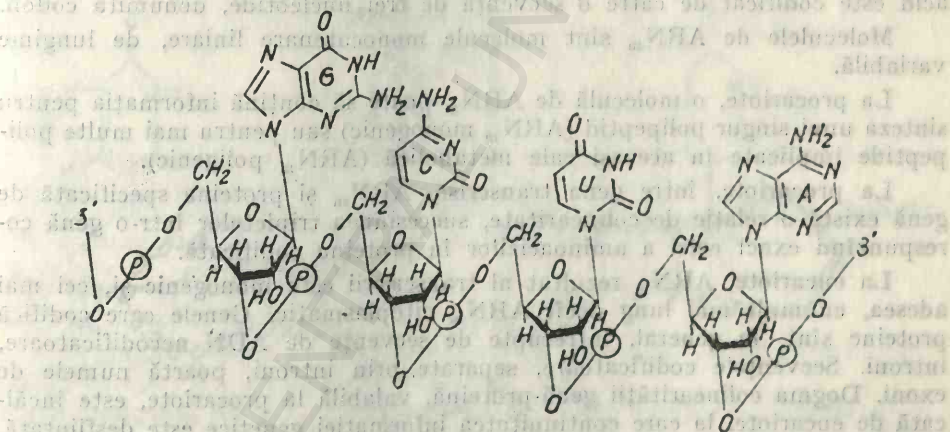


Fig. IV. 18 — Structura covalentă a ARN.

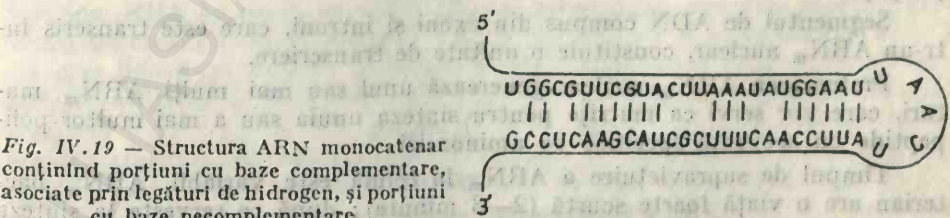


Fig. IV.19 — Structura ARN monocatenar conținînd porțiuni cu baze complementare, asociate prin legături de hidrogen, și porțiuni cu baze necomplementare.

După rolul ce le revine în procesul de biosinteză a proteinelor ARN pot fi:

— ARN mesager ( $ARN_m$ )

— ARN de transfer sau solubil ( $ARN_t$ )

— ARN ribozomal ( $ARN_r$ ).

#### IV.5.1. ARN MESAGER ( $ARN_m$ )

Ținând seama de faptul că molecula de ADN se găsește în nucleu, în timp ce biosinteza proteinelor se desfășoară în citoplasmă, Jacob și Monod au postulat existența unui intermediar care „aduce” mesajul genetic din nucleu în citoplasmă. Acest intermediar s-a dovedit a fi o moleculă de ARN, denumită ulterior ARN mesager.

$ARN_m$  este sintetizat în nucleu pe matriță de ADN. O genă structurală este transcrisă, în sensul complementarității bazelor (A corespunde la U iar G la C), obținându-se o moleculă de  $ARN_m$  a cărei compoziție în baze reflectă compoziția în baze a genei transcrise.

$ARN_m$  nuclear iese în citoplasmă (la eucariote după „prelucrarea” sa și formarea unui  $ARN_m$  matur), unde va servi ca matriță (template) pentru sinteza unui polipeptid cu o secvență specifică de aminoacizi. Fiecare aminoacid este codificat de către o secvență de trei nucleotide, denumită codon.

Moleculele de  $ARN_m$  sînt molecule monocatenare liniare, de lungime variabilă.

La procariote, o moleculă de  $ARN_m$  poate să conțină informația pentru sinteza unui singur polipeptid ( $ARN_m$  monogenic) sau pentru mai multe polipeptide implicate în aceeași cale metabolică ( $ARN_m$  poligenic).

La procariote, între gena transcrisă,  $ARN_m$  și proteina specificată de genă există o relație de colinearitate, succesiunea tripletelor într-o genă corespunzînd exact celei a aminoacizilor în proteina codificată.

La eucariote,  $ARN_m$  rezultat al transcrierii este monogenic și, cel mai adesea, cu mult mai lung decît  $ARN_m$  citoplasmatic. Genele care codifică proteine sînt, în general, întrerupte de secvențe de ADN necodificatoare, introni. Secvențele codificatoare, separate prin introni, poartă numele de exoni. Dogma colinearității genă-proteină, valabilă la procariote, este încălcată de eucariote, la care continuitatea informației genetice este desființată. Gena nu mai este corespondentul structural al  $ARN_m$ , subiect al traducerii, fiind cu mult mai lungă decît ar fi necesar pentru codificarea unui anumit polipeptid.

Segmentul de ADN compus din exoni și introni, care este transcris într-un  $ARN_m$  nuclear, constituie o unitate de transcriere.

Prelucrarea  $ARN_m$  nuclear generează unul sau mai mulți  $ARN_m$  maturi, care vor servi ca matrițe pentru sinteza unuia sau a mai multor polipeptide cu secvențe specifice de aminoacizi.

Timpul de supraviețuire a  $ARN_m$  în celulă este variabil.  $ARN_m$  bacterian are o viață foarte scurtă (2—3 minute); după ce servește la sinteza



citorva zeci de exemplare din proteina pe care o specifică, este degradat de nucleaze.

La eucariote,  $ARN_m$  are o viață de ordinul orelor; această diferență este ușor de înțeles ținând seama de fluctuațiile mari de mediu la care o bacterie se obținează să se adapteze continuu.

#### IV.5.2. ARN DE TRANSFER (ARN<sub>t</sub>)

Moleculele de ARN<sub>t</sub> sînt molecule mici (70—90 nucleotide), monocatenare, în care procentul de baze complementare este deosebit de mare față de celelalte specii de ARN. Raportul  $A + G/U + C$  din ARN<sub>t</sub> este apropiat de 1.

ARN<sub>t</sub> prezintă o conformație în „foaie de trifoi”, avînd 4 zone de perechi complementare și trei necomplementare, expulzate ca bucle (fig. IV.20).

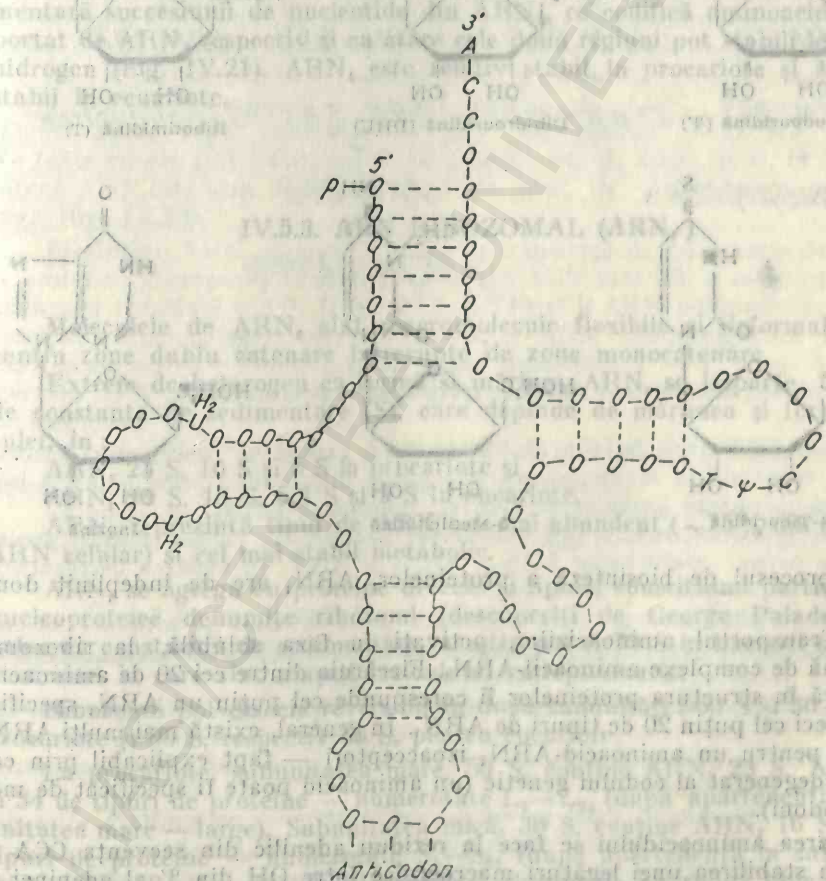
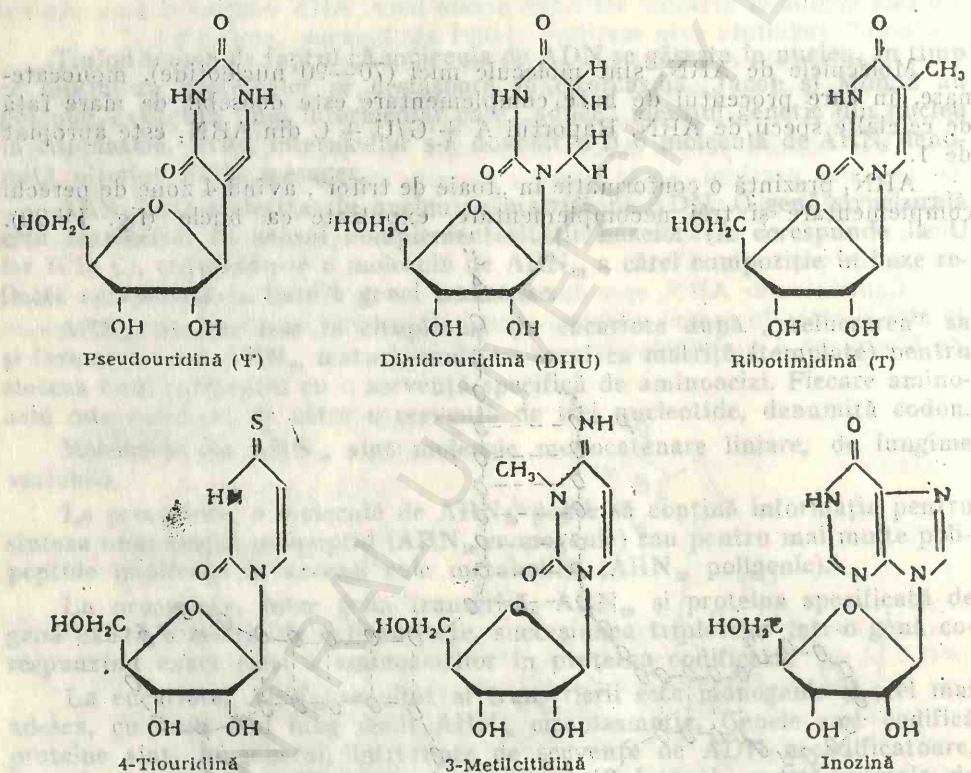


Fig. IV.20 — Structura tridimensională a ARN<sub>t</sub>.

La capătul 5' terminal, cei mai mulți ARN<sub>i</sub> au restul acid guanilic, iar la capătul 3', toți au secvența nucleotidică CCA. La capătul buclei inferioare se găsește așa-numita porțiune anticodon, care variază cu natura ARN<sub>i</sub>. Și alte secvențe nucleotidice sînt importante în procesele de recunoaștere; de exemplu, în brațul DHU există o secvență nucleotidică care recunoaște și se leagă specific la aminoacil-ARN<sub>i</sub>-sintetază, enzimă care „încarcă” ARN<sub>i</sub> cu un aminoacid specific, activat. În brațul TΨC, o anumită secvență nucleotidică asigură legarea la ribozom a complexului aminoacil-ARN<sub>i</sub>.

Toate tipurile de ARN<sub>i</sub> au un procent neobișnuit de mare de baze minore :



În procesul de biosinteză a proteinelor, ARN<sub>i</sub> are de îndeplinit două funcții :

1. Transportul aminoacizilor, activați în faza solubilă, la ribozomi, sub formă de complexe aminoacil-ARN<sub>i</sub>. Fiecăruia dintre cei 20 de aminoacizi care intră în structura proteinelor îi corespunde cel puțin un ARN<sub>i</sub> specific. Există deci cel puțin 20 de tipuri de ARN<sub>i</sub>. În general, există mai mulți ARN<sub>i</sub> specifiți pentru un aminoacid-ARN<sub>i</sub> izoacceptori — fapt explicabil prin caracterul degenerat al codului genetic (un aminoacid poate fi specificat de mai mulți codoni).

Legarea aminoacidului se face la residuu adenilic din secvența CCA și constă în stabilirea unei legături macroergice între OH din 3' al adeninei și restul acil al aminoacidului (vezi sinteza proteinelor).



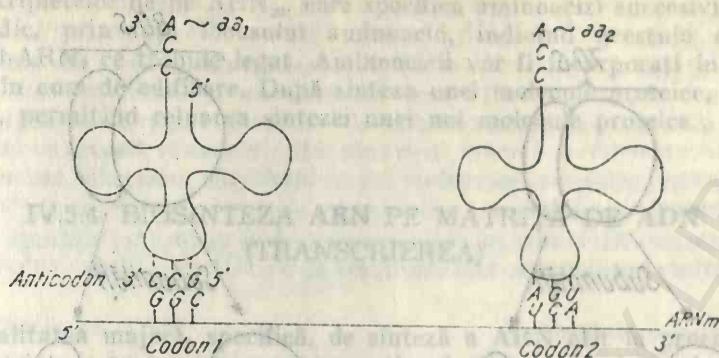


Fig. IV.21 — Recunoașterea codon-anticodon.

2. Adaptarea aminoacidului transportat în dreptul codonului de pe ARN<sub>m</sub> care-l specifică. Această racordare a aminoacidului este posibilă prin recunoașterea codon-anticodon. Porțiunea anticodon din ARN<sub>t</sub> este complementară succesiunii de nucleotide din ARN<sub>m</sub> ce codifică aminoacidul transportat de ARN<sub>t</sub>, respectiv și ea atare cele două regiuni pot stabili legături de hidrogen (Fig. IV.21). ARN<sub>t</sub> este relativ stabil în procariote și mai puțin stabil în eucariote.

#### IV.5.3. ARN RIBOZOMAL (ARN<sub>r</sub>)

Moleculele de ARN<sub>r</sub> sînt macromolecule flexibile și deformabile, care conțin zone dublu catenare întrerupte de zone monocatenare.

Extrem de heterogen ca formă și mărime, ARN<sub>r</sub> se împarte, în funcție de constanta de sedimentare (S), care depinde de mărimea și forma particulei, în :

ARN<sub>r</sub> 23 S, 16 S și 5 S la procariote și

ARN<sub>r</sub> 28 S, 18 S, 5,8 S și 5 S la eucariote.

ARN<sub>r</sub> reprezintă tipul de ARN cel mai abundent (~75% din totalul de ARN celular) și cel mai stabil metabolic.

ARN<sub>r</sub> se agregă cu proteine diverse și lipide, constituind particule ribonucleoproteice denumite ribozomi (descoperiți de George Palade). După valoarea constantei de sedimentare, aceștia pot fi 70 S la bacterii și 80 S la eucariote, la care sînt atașați reticulului endoplasmatic.

Ribozomii pot disocia reversibil în două subunități : 50 S și 30 S pentru procariote și 60 S, respectiv 40 S, pentru eucariote.

La procariote, subunitatea mare, 50 S, conține ARN<sub>r</sub> 23 S, ARN<sub>r</sub> 5 S și 34 de tipuri de proteine — numerotate L<sub>1</sub>—L<sub>34</sub> (după apartenența la subunitatea mare — large). Subunitatea mică, 30 S, conține ARN<sub>r</sub> 16 S și 21 de tipuri de proteine — numerotate S<sub>1</sub>—S<sub>21</sub> (după apartenența la subunitatea mică — small) (fig. IV.22). Proteinele ribozomale au roluri bine stabilite, nu în întregime descifrate, decurgînd fie din capacitatea catalitică (peptidil-

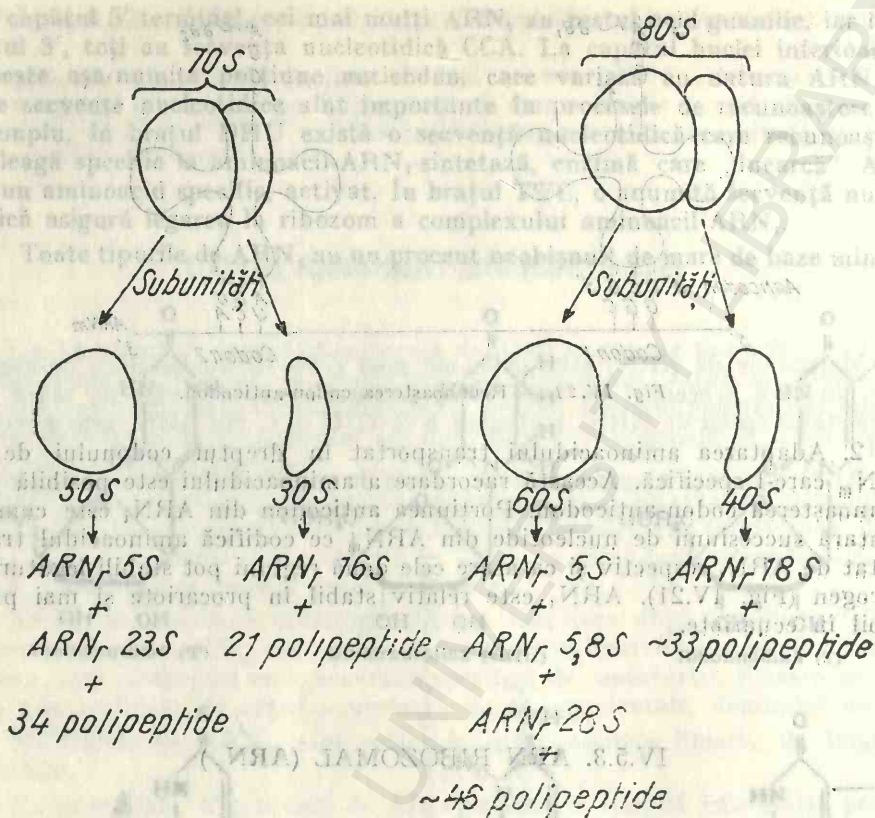


Fig. IV.22 — Ribozomii la procariote și eucariote.

transferaze, GTP-aze), fie din abilitatea de a „construi” arhitecturi stereo-specifice, esențiale în recunoașterea și legarea diverselor tipuri de ARN implicate în biosinteza proteinelor (ARN<sub>m</sub>, aminoacil-ARN<sub>t</sub>).

Ribozomii constituie sediul biosintezei proteinelor. Aceste unități mecano-chimice permit conlucrarea ARN<sub>m</sub>, ARN<sub>t</sub> și ARN<sub>r</sub> în vederea desfășurării procesului de sinteză a proteinelor.

Pe suprafața fiecărui ribozom există două situri și anume: situsul aminoacid, care leagă ARN<sub>t</sub> purtător al unui aminoacid, și situsul peptid, care leagă ARN<sub>t</sub> purtător al unui lanț polipeptidic.

Subunitatea mică a ribozomului (30 S sau 40 S) leagă ARN<sub>m</sub> într-un loc specific, astfel încât ribozomul să se afle cu locusul peptid în fața codonului care specifică aminoacidul inițiator și cu locusul aminoacid în fața codonului ce specifică aminoacidul 2.

Legarea subunității mari la complexul ARN<sub>m</sub> — subunitate mică determină formarea ribozomului funcțional. ARN<sub>m</sub> și ribozomii se pot deplasa unul în raport cu celălalt, ribozomul glisînd pe ARN<sub>m</sub> sau, ceea ce este totuna, ARN<sub>m</sub> deplasîndu-se față de ribozom. Această deplasare reciprocă permite



trecerea tripletelor de pe  $ARN_m$ , care specifică aminoacizi succesivi în lanțul polipeptidic, prin fața locusului aminoacid, indicînd acestuia complexul aminoacil- $ARN$ , ce trebuie legat. Aminoacizii vor fi încorporați în molecula proteică în curs de edificare. După sinteza unei molecule proteice, ribozomii disociază, permițînd reluarea sintezei unei noi molecule proteice.

#### IV.5.4. BIOSINTEZA $ARN$ PE MATRIȚĂ DE $ADN$ (TRANSCRIEREA)

Modalitatea majoră, specifică, de sinteză a  $ARN$  atît la procariote, cît și la eucariote este transcrierea, respectiv sinteza moleculelor de  $ARN$  pe matriță de  $ADN$ . Pe una dintre catenele duplexului de  $ADN$  nuclear se edifică o catenă de  $ARN$  complementară cu porțiunea de  $ADN$  transcrisă. În acest mod, structura  $ARN$  este decisă, dictată, de structura matriței; compoziția în baze a  $ARN$  reflectă compoziția în baze a fragmentului de  $ADN$  transcris. De menționat că, spre deosebire de replicare, care angajează simultan întregul cromozom, transcrierea vizează numai anumite porțiuni de  $ADN$ , acelea care codifică proteinele de care celula are nevoie la un moment dat.

În vivo, transcrierea este asimetrică, în sensul că într-o anumită regiune a genomului se copiază o singură catenă de  $ADN$ , desemnată drept catenă sens, spre deosebire de cea netranscrisă — catenă antisens. Nu toate genele sînt transcrise de pe aceeași catenă, astfel încît, în timp ce o catenă  $ADN$  este sens pentru un grup de gene, ea este antisens pentru alt grup (fig. IV.23).

Biosinteza  $ARN$ , moment crucial în transferul de informație de la  $ADN$  la proteine, presupune, în esență, prezența  $ADN$  matriță, a celor patru ribonucleozid trifosfați ( $ATP$ ,  $GTP$ ,  $CTP$ ,  $UTP$ ) și a  $ARN$  polimerazei- $ADN$  dependentă. Enzima construiește o catenă de  $ARN$ , complementară cu catenă  $ADN$ -sens pentru o anumită genă, avînd polaritate  $5' \rightarrow 3'$ . Ca și  $ADN$ -polimeraza,  $ARN$ -polimeraza conține zinc și necesită prezența în mediu a ionilor de magneziu.

La procariote, o singură  $ARN$ -polimerază catalizează formarea tuturor tipurilor de  $ARN$  (ribozomal, mesager, de transfer).

La eucariote, există trei seturi de  $ARN$ -polimeraze, avînd o remarcabilă specializare în raport cu tipul de  $ARN$  sintetizat:  $ARN$ -polimeraza I asigură

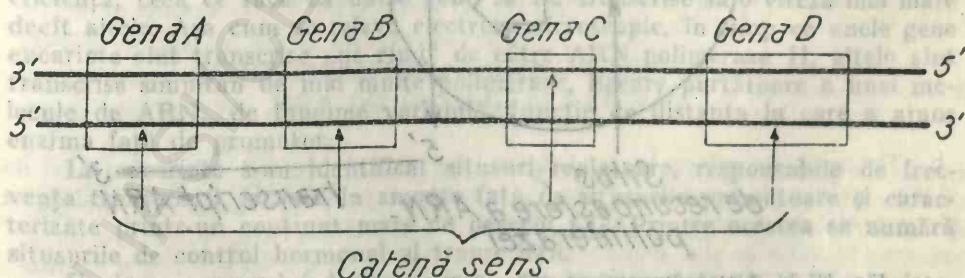


Fig. IV.23 — Transcrierea asimetrică a  $ADN$ .

sinteza ARN ribozomal, ARN polimeraza III, pe a celui de transfer, în timp ce sarcina de a sintetiza ARN mesager revine ARN polimerazei II. În procesul transcrierii, esențială este recunoașterea pe molecula de ADN a unor semnale de inițiere și de terminare a transcrierii care să indice începutul și sfârșitul fragmentelor de ADN ce vor fi transcrise (unități de transcriere). Recunoașterea acestor secvențe este realizată de către ARN polimeraze, grație asocierii reversibile cu subunitățile accesorii ale enzimei  $\sigma$  (sigma), respectiv,  $\rho$  (rho).

Sinteza de ARN, atât la procariote cât și la eucariote, decurge după un model similar, implicând următoarele etape:

### 1. Inițierea sintezei

ARN polimeraza se leagă la o secvență specifică de nucleotide din molecula ADN, care poartă numele de promotor. Secvența nucleotidelor în regiunea promotor a fost stabilită pentru un număr mare de gene bacteriene, fapt care a permis imaginarea unui model general de promotor. Locusul promotor este constituit din aproximativ 40 de perechi de nucleotide. ARN polimeraza recunoaște, cu ajutorul factorului  $\sigma$ , o secvență nucleotidică la care se leagă (locusul de legare laxă a ARN polimerazei). Factorul  $\sigma$  crește afinitatea enzimei pentru acest locus de  $10^4$  ori în raport cu alte locusuri de pe ADN. În afara acestui locus de legare, ARN polimeraza mai recunoaște o secvență de șase nucleotide (secvența Pribnow), situată la distanță de aproximativ 25 de nucleotide față de primul locus și de 10 nucleotide față de punctul de inițiere a transcrierii. Această secvență ar răspunde de exactitatea cu care este inițiată transcrierea (imperios, la nucleotidul 1 al genei de transcris) (fig. IV.24). Procentul ridicat de perechi A-T favorizează desfacerea dublei helice de ADN și expunerea catenei sens ce va servi ca matrice pentru sinteza ARN.

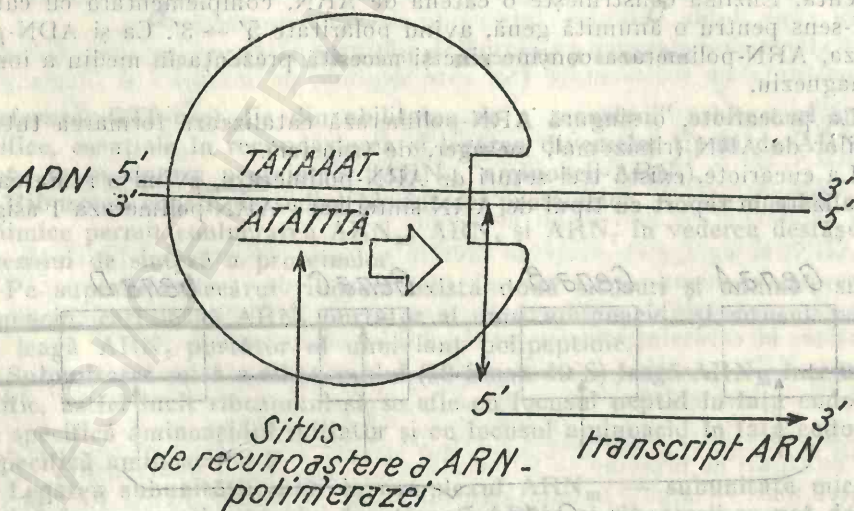


Fig. IV.24. ARN-polimeraza se află cu situsul catalitic în dreptul semnalului de inițiere a transcrierii.



Secvențele Pribnow din diferiți promotori sînt similare, dar nu identice, fapt care ar sta la baza diferenței în eficiența diversilor promotori și care s-ar traduce în variația cantității de ARN într-o celulă. Și la eucariote s-au identificat motive structurale comune pentru diverse situsuri promotoare (secvențe Hogness), analoge celor de la procariote, implicate de asemenea în asigurarea vitezei și acurateții transcrierii.

Formarea complexului de inițiere a transcrierii presupune legarea primului nucleozid trifosfat, cel care va constitui capătul 5' terminal al ARN și care este de regulă un nucleotid purinic, la ARN polimeraza (legată la ADN), al cărui locus catalitic se află în punctul de start al transcrierii (fig. IV.24).

## 2. Elongarea ARN

Primul ribonucleozid trifosfat, complementar cu primul dezoxiribonucleozid trifosfat din fragmentul de ADN ce va fi transcris, efectuează un atac nucleofil asupra  $\alpha$ -fosfatului din nucleozid trifosfatul următor, selectat și impus de catena sens în conformitate cu legea complementarității bazelor. Între cele două nucleotide se stabilește prima legătură fosfat diesterică. După acest eveniment, are loc disocierea factorului  $\sigma$ , întrucît elongarea catenei presupune o afinitate nediscriminatorie a ARN polimerazei pentru întreg segmentul de ADN transcris. Se permit astfel glisarea enzimei de-a lungul matriței de ADN și continuarea transcrierii, lanțul în creștere extinzîndu-se prin adăugarea succesivă la capătul 3'-OH a cite unui nucleotid, selectat pentru abilitatea sa de a stabili legături de hidrogen cu dezoxiribonucleotidul din catena sens la care s-a ajuns cu transcrierea (fig. IV.25).

## 3. Terminarea transcrierii

Oprirea transcrierii s-ar realiza la nivelul unor secvențe nucleotidice specifice de pe catena ADN care conține un număr mare de reziduri G și C și sînt recunoscute de ARN polimeraze. Important în recunoașterea semnalelor de terminare este factorul  $\rho$ , care se asociază ARN-polimerazei. Aceasta își încetează acțiunea, „coboară” de pe matriță, putînd să reia procesul de transcriere prin reasociere cu factorul  $\sigma$  (fig. IV.25).

Duplexul hibrid ADN-ARN are o existență limitată; el se desface permițînd ultimei porțiuni care a fost transcrisă să reformeze dublul helix ADN.

De remarcat că toate tipurile de ARN se sintetizează pe matriță de ADN, fiind deci rezultatul transcrierii.

Așa cum s-a menționat anterior, nu toate situsurile promotor au aceeași eficiență, ceea ce face ca unele gene să fie transcrise la o viteză mai mare decît altele. Așa cum se relevă electronomicroscopic, în timp ce unele gene eucariote sînt transcrise „pe rînd” de către ARN polimeraza II, altele sînt transcrise simultan de mai multe polimeraze, fiecare purtătoare a unei molecule de ARN<sub>n</sub> de lungime variabilă, funcție de distanța la care a ajuns enzima față de promotor.

La eucariote s-au identificat situsuri reglatoare, responsabile de frecvența transcrierii, situate în amonte față de situsurile promotoare și caracterizate printr-un conținut mare de perechi CG. Printre acestea se numără situsurile de control hormonal al transcrierii.

Reglarea procesului de transcriere, atît la procariote cît și la eucariote, va fi tratată ulterior.

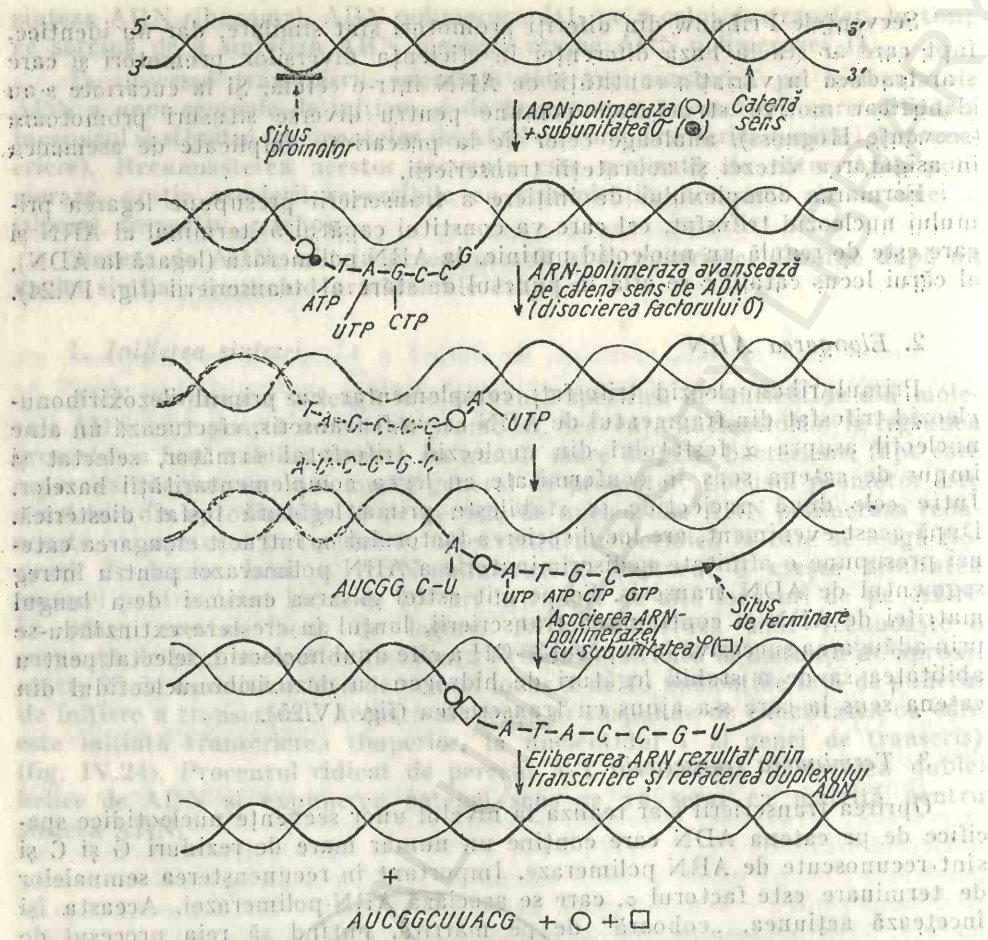


Fig. IV.25 — Ilustrarea procesului de transcriere cu sublinierea rolului ARN polimerazei și a factorilor  $\sigma$  și  $p$ .

Transcrierea ADN este suprimată de unii compuși exogeni, fie prin modificarea structurii ADN astfel încât acesta să nu mai poată servi ca matriță (Actinomicina D), fie prin inhibarea ARN polimerazei (Rifampicina,  $\alpha$ -amanitina, substanță toxică din ciuperca *Amanita phalloides*).

#### IV.5.5. PRELUCRĂRI POSTTRANSCRIERE ALE MOLECULELOR DE ARN

Procesul se referă la modificările pe care le suferă diferitele tipuri de ARN înainte de implicarea lor în biosinteza proteinelor. Aceste modificări decurg atât în nucleu, cât și în citoplasmă și presupun:

- eliminarea din moleculă a unor fragmente polinucleotidice;
- adăugarea unor fragmente polinucleotidice;
- modificări în structura nucleozidelor.



## ARN<sub>i</sub>

Moleculele de ARN<sub>i</sub> provin din precursori mult mai mari, care au suferit clivări ale unor nucleotide, sub acțiunea unor nucleaze, ca și metilări, tiolări, catalizate enzimatic, ce duc la formarea nucleotidelor minore. De o deosebită importanță în preluarea posttranscripțională a ARN<sub>i</sub> este adăugarea la capătul 3' al moleculei a secvenței CCA, esențială în legarea aminoacidului.

## ARN<sub>m</sub>

Modificări posttranscripționale semnificative se produc în cazul ARN<sub>m</sub> eucariot. ARN<sub>m</sub>, sintetizat prin transcrierea unui fragment de ADN, suferă în nucleu o serie de transformări, care fac ca transcriptul primar, nuclear, să fie convertit la un ARN<sub>m</sub> matur, care trece în citoplasmă, pentru a servi ca matriță în sinteza proteinelor.

Moleculele de ARN<sub>m</sub> sînt modificate la capete în sensul adăosului la capătul 5' al unui rest de 7-metil-guanozină (legată prin legătură trifosforică de transcriptul primar) (fig. IV.26) și a unui fragment poliadenilic (de 100—200 nucleotide), la capătul 3'. „Marcarea” capătului 5' al ARN<sub>m</sub> este importantă, fiind recunoscută de către ribozom ca semnal de inițiere a sintezei proteinelor. Semnificația poliadenilării la capătul 3' este obscură; s-ar părea că mărește stabilitatea ARN<sub>m</sub> la acțiunea unor enzime degradative. Prezența cozii poliA s-a dovedit extrem de utilă pentru biochimist. Ea servește ca inițiator în sinteza ADN pe matriță de ARN, deci la obținerea ADN<sub>c</sub> utilizat în tehnicile de clonare, ca și la izolarea și purificarea ARN<sub>m</sub> din totalul de ARN celular, din care el reprezintă numai o mică parte.

Modificarea majoră pe care o suferă transcriptul primar la eucariote constă însă în „scurtarea” sa. Cercetările ultimilor ani au arătat că o moleculă de ARN rezultată prin transcrierea unei gene structurale ajunge la locul de sinteză a proteinelor cu mult mai scurtă decît porțiunea de genom ce corespunde proteinei respective. Constatarea a avut ca punct de plecare obser-

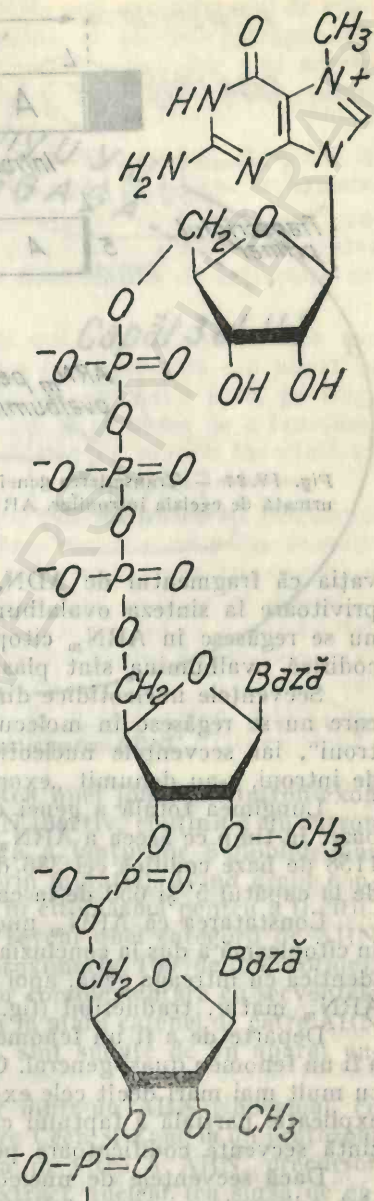


Fig. IV.26 — Marcarea capătului 5' al ARN<sub>m</sub> (5' cap).

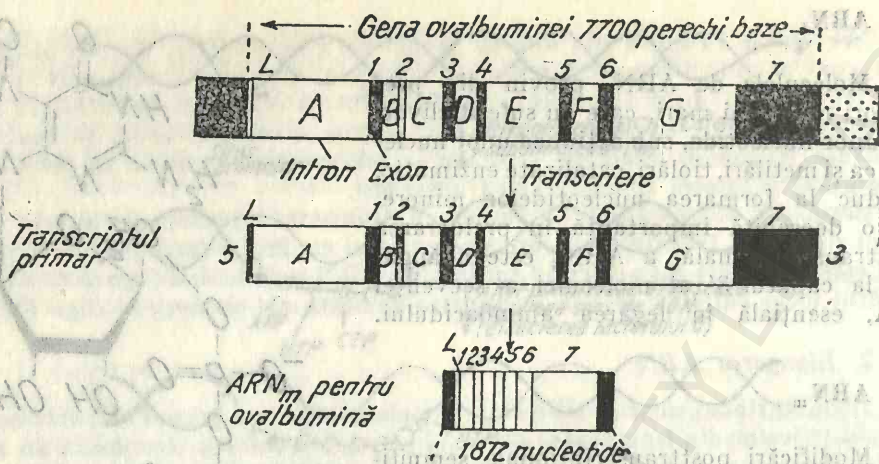


Fig. IV.27 — Transcrierea genei de ovalbumină, cu obținerea transcriptului primar, urmată de excizia intronilor. ARNm matur rezultat va servi ca matriță pentru sinteza ovalbuminei.

vația că fragmentul de ADN, corespunzător ARN<sub>m</sub> ce conține informația privitoare la sinteza ovalalbuminei, este întrerupt de secvențe de ADN ce nu se regăsesc în ARN<sub>m</sub> citoplasmatic. Rezultă că secvențele de baze care codifică ovalbumina sînt plasate discontinuu în genom.

Secvențele nucleotidice din cuprinsul genei corespunzătoare ovalbuminei care nu se regăsesc în molecula de ARN<sub>m</sub> citoplasmatic s-au denumit „intronii”, iar secvențele nucleotidice transcriptibile și traducibile, delimitate de introni, s-au denumit „exoni”.

Lungimea totală a genei de ovalbumină corespunde la 7700 perechi de baze, în timp ce aceea a ARN<sub>m</sub> citoplasmatic, la numai 1872. Dintre acestea, 1158 de baze codifică cei 386 de aminoacizi ai proteinei, iar 64 de nucleotide de la capătul 5' și 650 de la capătul 3' al ARN<sub>m</sub> nu sînt traduse.

Constatarea că ARN<sub>m</sub> nuclear este mai lung decît același ARN<sub>m</sub> ajuns în citoplasmă a dus la concluzia că ARN polimeraza realizează o copie primară identică cu întreaga genă, apoi intronii sînt excizați și exonii se leagă formînd ARN<sub>m</sub> matur, traducibil (fig. IV.27).

Departă de a fi un fenomen izolat, discontinuitatea genelor s-a dovedit a fi un fenomen quasi-general. Cel mai adesea, secvențele intron au dimensiuni cu mult mai mari decît cele exon (de peste 100 de ori), ceea ce ar constitui o explicație parțială a faptului că numai 5—10% din genomul eucariot reprezintă secvențe codificatoare pentru proteine și ARN.

Dacă secvențele de nucleotide dintr-un ADN codificînd o proteină nu sînt adiacente, ci secvențele codificatoare sînt întrerupte de secvențe necodificatoare, este evident că la eucariote nu se mai poate vorbi de colinearitatea genă-proteină, ci numai de o coliniaritate exon-fragment din proteina specificată (corespunzînd, probabil, unui domeniu funcțional al proteinei).

#### Excizia intronilor din transcriptul primar

Excizia intronilor din ARN precursor, biologic inactiv, se realizează în nucleu sub acțiunea unor enzime specializate, care trebuie să recunoască secvențele de baze la joncțiunea intron-exon (invariabil intronii au la capătul



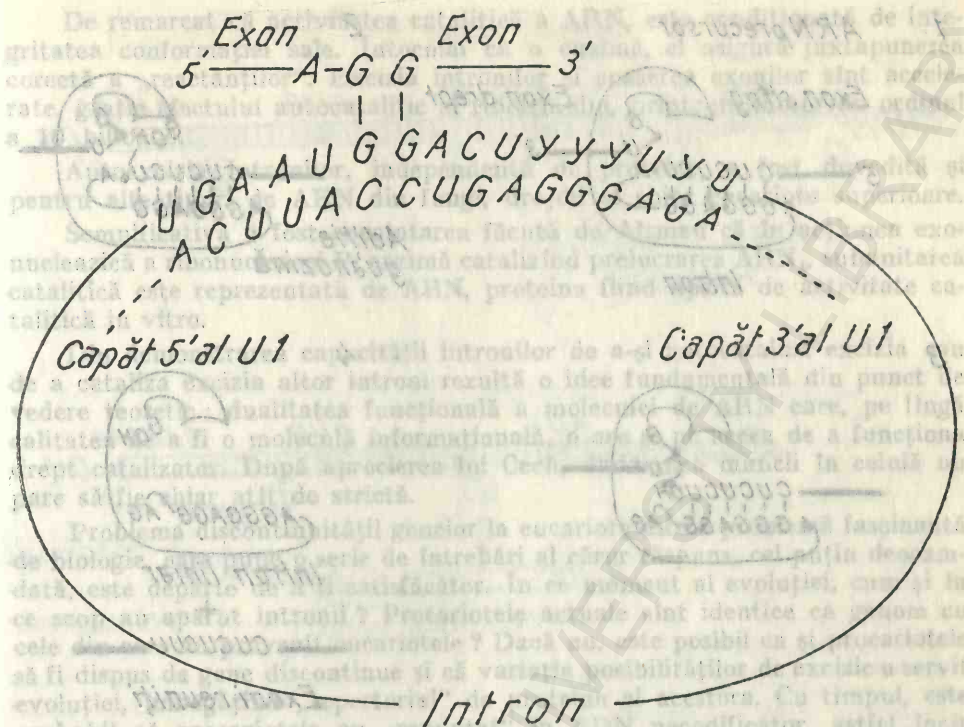


Fig. IV.28 — Excizia intronilor cu participarea ARN<sub>U</sub>.

5' GU iar la cel 3', AG). Mutații în vecinătatea unei joncțiuni intron-exon interferează cu excizia intronilor și generează ARN inactiv, conținând un intron rezidual. În unele  $\beta$ -thalasemii sinteza scăzută a lanțurilor  $\beta$ -globină s-ar datora unui defect de excludere a intronilor (prin mutație), având drept consecință incapacitatea ARN nuclear de a „ieși” în citoplasmă pentru a fi citit.

În excizia intronilor un rol important ar reveni unei categorii de ARN nuclear, de masă moleculară foarte mică (aproximativ 100 de nucleotide), desemnat ARN<sub>U</sub>, care are o secvență a bazelor complementară cu secvențele de la capetele fiecărui intron. Intronii sînt scoși în afara catenei de către ARN nuclear și capetele exonilor, corect juxtapuse, sînt sudate de un aparat enzimatic specializat (fig. IV.28).

O altă modalitate de excizie a intronilor dintr-un ARN ribozomal, cu totul surprinzătoare, a fost evidențiată de către Cech și Zaugg la un protozoar ciliat — *Tetrahymena thermophila*. Incubarea in vitro a ARN<sub>r</sub> precursor (transcript primar) cu nucleozid trifosfați și extract nuclear (ca sursă de enzimă, catalizînd procesul de excizie a intronilor și coasere a exonilor) a dus la concluzia că adaosul de extract nuclear era inutil. Se contura ideea intervenției autocatalitice a ARN<sub>r</sub> în procesul de excizie-coasere, idee greu de acceptat, care extindea la acizii ribonucleici un atribut aparținînd exclusiv proteinelor.

Lucrîndu-se în medii în care contaminarea cu proteină era exclusă (ARN<sub>r</sub> obținut prin tehnicile ingineriei genetice și nu prin extracție din nucleu), concluzia indubitabilă era aceea că ARN<sub>r</sub> catalizează excizia intronilor

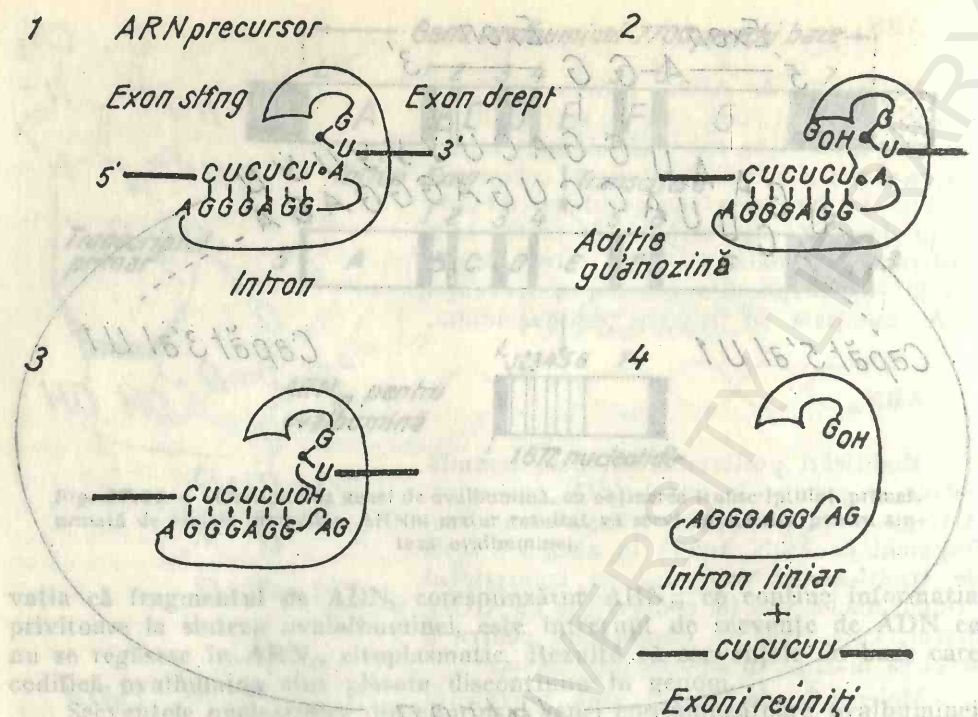


Fig. IV.29 — Excizia autocatalitică a intronilor din ARNr la *Tetrahymena thermophila*.

și coaserea propriilor exoni. Acestui tip de ARN, izolat din *Tetrahymena thermophila* i s-a dat numele de ribozim, pentru a-i consfinți activitatea autocatalitică și a marca și diferențele față de activitatea enzimelor clasice (rămân neschimbate după exercitarea acțiunii).

În lămurirea mecanismului de acțiune a ribozimului, decisivă a fost constatarea că la unul din capetele intronului excizat se găsește un rest de guanozină care nu exista în ADN. GTP nu era folosit în scopuri energetice ci ca agent nucleofil, apt să desfacă legătura fosfatdiesterică de la unul din capetele intronului.

Legarea guanozinei la un loc specific din porțiunea intron o orientează astfel încât o grupare —OH a acesteia să poată ataca legătura fosfatdiesterică de la joncțiunea exon-capătul 5' al intronului. La capătul 5' al exonului există o secvență de 6 nucleotide pirimidinice CUCUCU, care se împerechează cu o porțiune din intron GGAGGG. Așezată convenabil steric, guanozina atacă joncțiunea exon-intron (capătul 5'). Această primă transesterificare are ca rezultat legarea G la A și eliberarea capătului 3' al exonului I (fig. IV.29). Uracilul, devenit capătul 3' OH liber al exonului I, efectuează o a doua transesterificare cu U de la capătul 5' al exonului II, realizând, odată cu excluderea intronului, coaserea celor doi exoni.



De remarcat că activitatea catalitică a  $ARN_m$  este condiționată de integritatea conformației sale. Întocmai ca o enzimă, el asigură juxtapunerea corectă a „reactanților“. Excizia intronilor și coaserea exonilor sînt accelerate, grație efectului autocatalitic al ribozimului, printr-un factor de ordinul a  $10^6$  bilioane.

Autoexcizia intronilor, independentă de proteine, a fost dovedită și pentru alte tipuri de  $ARN$  din fungi, drojdii și chiar eucariote superioare.

Semnificativă a fost constatarea făcută de Altman că în acțiunea exonucleazică a ribonucleazei P, enzimă catalizînd prelucrarea  $ARN_m$ , subunitatea catalitică este reprezentată de  $ARN$ , proteina fiind lipsită de activitate catalitică *in vitro*.

Din demonstrarea capacității intronilor de a-și autocataliza excizia sau de a cataliza excizia altor introni rezultă o idee fundamentală din punct de vedere teoretic: dualitatea funcțională a moleculei de  $ARN$  care, pe lângă calitatea de a fi o moleculă informațională, o are și pe aceea de a funcționa drept catalizator. După aprecierea lui Cech, diviziunea muncii în celulă nu pare să fie chiar atît de strictă.

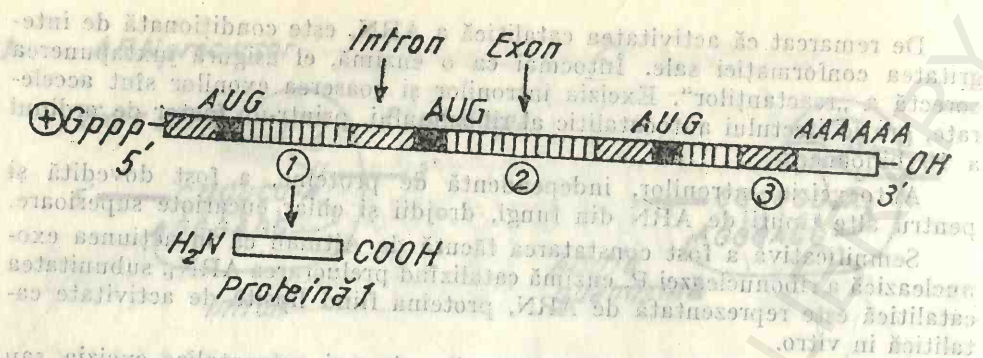
Problema discontinuității genelor la eucariote este o problemă fascinantă de biologie, care pune o serie de întrebări al căror răspuns, cel puțin deocamdată, este departe de a fi satisfăcător. În ce moment al evoluției, cum și în ce scop au apărut intronii? Procariotele actuale sînt identice ca genom cu cele din care au provenit eucariotele? Dacă nu, este posibil ca și procariotele să fi dispus de gene discontinue și că variația posibilităților de excizie a servit evoluției, îmbogățind „repertoriul“ de proteine al acestora. Cu timpul, este probabil că procariotele au „renunțat“ la ADN necodificator, astfel încît să-și mărească viteza de creștere, prin scăderea cantității de ADN ce trebuia replicată în fiecare generație.

Este prezența intronilor avantajoasă eucariotelor sau pur și simplu s-au păstrat prin lipsa unui aparat de excludere a intronilor? S-ar părea că prezența lor este avantajoasă.

Se conturează ideea intervenției intronilor în procesul de diferențiere celulară. Mai mult, transportul  $ARN$  din nucleu în citoplasmă pare să depindă de prezența intronilor. Într-adevăr, anumiți  $ARN$  obținuți prin transcrierea unui ADN complementară unui  $ARN$  matur (sub acțiunea revers transcriptazei) nu părăsesc nucleul. Unii introni codifică porțiuni dintr-o enzimă, maturaza, implicată în însuși transportul  $ARN$ .

Cercetări recente au demonstrat o mare flexibilitate a „aparaturii de excizie și sudură“ ale diverselor regiuni din  $ARN_m$  la eucariote, astfel încît, dintr-un singur transcript primar pot rezulta numeroși  $ARN_m$  maturi și deci proteine diferite. Numeroase alternative de prelucrare a  $ARN_m$  primar s-au demonstrat în cazul unor adenovirusuri care infectează celulele umane și în cazul limfocitelor, care produc în decursul dezvoltării celulare variante de anticorpi, folosind același transcript primar.

În fig. IV.30 se reprezintă prelucrarea unui transcript primar viral generînd trei tipuri de  $ARN_m$ , fiecare corespunzînd unei proteine. Această posibilitate rezultă din tratarea unor exoni ca introni și excizia lor, urmată de coaserea semnalului de inițiere (5' cap) la diverse secvențe codificatoare, soldată cu sinteza uneia dintre cele trei proteine.



Din demonstrația capacității intronilor de a-și autocataliza existența sau de a cataliza existența unor introni rezultă o idee fundamentală din punct de vedere teoretic: analizele funcționale a intronilor de ARN care, pe lângă calitatea lor de intermediari în procesul de traducere, pot avea și funcții de catalizatori în procesul de traducere. Problema disacutată în acest articol este de a vedea dacă este posibil să se găsească în natură introni care să aibă o funcție de catalizatori în procesul de traducere. În acest scop se vor prezenta câteva exemple de introni care au fost găsiți în natură și care au fost găsiți să aibă o funcție de catalizatori în procesul de traducere. Aceste introni sunt găsiți în natură și au fost găsiți să aibă o funcție de catalizatori în procesul de traducere. Aceste introni sunt găsiți în natură și au fost găsiți să aibă o funcție de catalizatori în procesul de traducere.

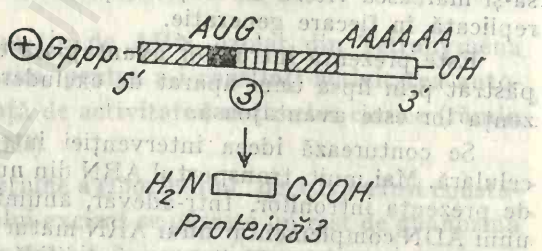


Fig. IV.30 — Prelucrarea unui ARN<sub>m</sub> nuclear cu obținerea a trei proteine diferite. (+Gppp-capătul 5' marcat necesar traducerii).

### IV.5.6. BIOSINTEZA ARN PE MATRIȚĂ DE ARN

Unele virusuri conțin ca material cromozomial ARN. Replicarea acestui ARN în celula gazdă are loc sub acțiunea unei replicaze, o ARN polimerază — ARN dependentă, analoagă, ca mecanism de acțiune, ARN polimerazei — ADN dependentă. Replicazele se sintetizează în organismul gazdă ca răspuns la infecția virală. Ele manifestă o specificitate surprinzătoare, folosind ca matriță exclu-



Fig. IV.31 — Sinteze de ARN pe matriță de ARN.

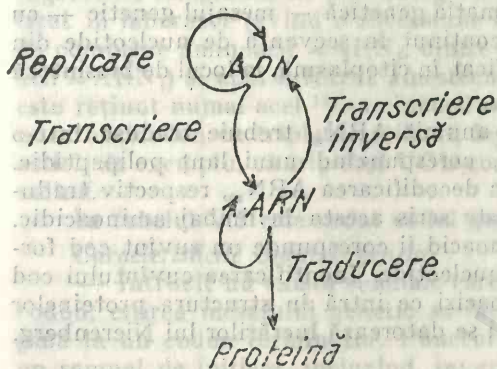
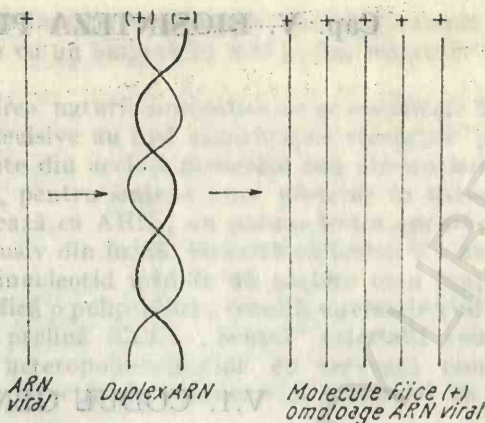


Fig. IV.32 — Completarea dogmei centrale a geneticii moleculare prin prisma descoperirii ADN-polimerazei — ARN dependentă și ARN-polimerazei — ARN dependentă.

siv ARN omolog (al virusului cu care a fost infectată celula). În felul acesta, în celula gazdă are loc replicarea ARN viral, nu și a ARN al celulei gazdă. ARN sintetizat pe matriță de ARN omolog nu este complementară, ci identică cu acesta. După infecție se sintetizează pe matrița ARN (+) o replică complementară (—), luînd naștere o dublă helice constituită dintr-o catenă ARN (+) și una ARN (—). Catenă ARN (—) va servi apoi ca matriță pentru sinteza a numeroase catene complementare (+) (fig. IV.31).

ARN viral va funcționa ca ARN<sub>m</sub> pentru sinteza proteinelor virale (spre deosebire de ARN al retrovirusurilor).

Ținînd seama atît de existența ADN polimerazei — ARN dependentă (revers transcriptaza), cît și a ARN replicazelor, dogma centrală a geneticii moleculare trebuie reconsiderată în sensul indicat în fig. IV.32.

### V.1. CODUL GENETIC

Așa cum s-a arătat anterior, informația genetică — mesajul genetic — cu privire la biosinteza proteinelor este conținut în secvența de nucleotide din ADN. Acest mesaj este transmis codificat în citoplasmă, la locul de biosinteză a proteinelor, prin sinteză de  $\text{ARN}_m$ .

Secvența de nucleotide dintr-un anumit  $\text{ARN}_m$  trebuie tradusă într-o succesiune specifică de acizi aminați, corespunzând unui lanț polipeptidic. Deci, în citoplasmă trebuie să aibă loc decodificarea  $\text{ARN}_m$ , respectiv traducerea limbajului nucleotidic în care este scris acesta în limbaj aminoacidic. Este de presupus că unui anumit aminoacid îi corespunde un cuvânt cod format dintr-o anumită succesiune de nucleotide. Identificarea cuvintului cod pentru fiecare dintre cei 20 de aminoacizi ce intră în structura proteinelor a constituit un eveniment remarcabil și se datorează lucrărilor lui Nierenberg, Ochoa, Khorana și Matthaei.

Descifrarea codului genetic, a relației dintre secvența de nucleotide din acizii nucleici (materialul informațional genetic) și secvența de aminoacizi dintr-un lanț polipeptidic, care reprezintă forma de exprimare a acestui mesaj, a ridicat numeroase probleme :

- aprecierea mărimii unității codificatoare, respectiv a numărului de nucleotide ce codifică un aminoacid ;

- stabilirea naturii unității codificatoare, a nucleotidelor ce formează unitatea ;

- determinarea secvenței nucleotidelor în unitatea codificatoare.

Evident, întrucât există 20 de aminoacizi și numai 4 nucleotide, este exclus ca un aminoacid să fie specificat de un singur nucleotid. Specificarea unui aminoacid prin două nucleotide este de asemenea insuficientă, întrucât se pot obține numai 16 cuvinte cod. În schimb, construirea unui cuvânt cod dintr-o succesiune de 3 nucleotide oferă 64 de posibilități, respectiv 64 de cuvinte cod pentru cei 20 de aminoacizi. Faptul că toate cuvintele cod sînt triplete, denumite codoni, a fost verificat prin experiențe simple și expresive cum ar fi :

- un  $\text{ARN}_m$  viral monogenic constituit din 1200 de nucleotide, codifică o proteină conținînd 400 de aminoacizi ;



— deleția (excluderea) sau inserția unui triplet într-un anumit  $ARN_m$  determină sinteza unei proteine cu un aminoacid mai puțin, respectiv cu unul în plus.

În ceea ce privește stabilirea naturii nucleotidelor ce constituie tripletul și a succesiunii lor în acesta, decisive au fost experiențele efectuate pe polinucleotide de sinteză, constituite din același nucleotid sau din nucleotide diferite, care au servit ca  $ARN_m$  pentru sinteza unor proteine în sisteme acelulare. De pildă, dacă se utilizează ca  $ARN_m$  un polinucleotid adenilic se obține o proteină constituită exclusiv din lizină. Rezultă că lizinei îi corespunde tripletul AAA. Analog, un polinucleotid uridilic dă naștere unui lanț polifenilalaninic, unul policitidilic edifică o poliprolină; rezultă cuvintele cod pentru fenilalanină (UUU) și pentru prolină (CCC). „Sensul” celorlalți codoni s-a stabilit prin utilizarea unor heteropolinucleotide cu secvență cunoscută, ținându-se seama de faptul că direcția de traducere a moleculei de  $ARN_m$  este 5'—3'.

Secvența bazelor într-un codon s-a precizat ca urmare a unei experiențe ingenioase imaginată de Nirenberg care a pus în contact cite un triplet sintetizat în laborator (avind o succesiune de baze cunoscută) cu ribozomi și cu 20 de complexe aminoacil  $\sim ARN_t$ , dintre care unul singur era marcat ( $^{14}C$ -aminoacil  $\sim ARN_t$ ) și apoi a filtrat amestecul pe nitroceluloză. Pe filtrul de celuloză este reținut numai acel  $^{14}C$ -aminoacil  $\sim ARN_t$  care s-a împerecheat prin porțiunea anticodon cu tripletul utilizat, legat specific la ribozomi. S-a demonstrat astfel, de exemplu, că tripletul UGU codifică cisteina, UUG, leucina, iar GUU valina.

În tabelul V.1 este redat codul genetic.

#### *Caracteristicile codului genetic*

— Întrucît nu există semnale care să indice începutul și sfîrșitul fiecărui codon, citirea mesajului genetic se face neîntrerupt, de la un codon start pînă la un codon terminator. Punctul de start în citire este reprezentat de un semnal de inițiere, incluzînd, invariabil, codonul de inițiere AUG. Codul genetic nu are deci virgule, semne de punctuație.

— Codul genetic este degenerat.

Dintre cele 64 de triplete, 61 specifică aminoacizi particulari. Cum nu există decît 20 de aminoacizi ce trebuie specificați, rezultă că unui singur aminoacid, îi pot corespunde mai multe cuvinte cod. Într-adevăr, așa cum se vede din tabelul V.1 numai triptofanul și metionina sînt specificați de către un singur codon, în timp ce alți aminoacizi, cum ar fi de exemplu serina și leucina, sînt codificați de cite 6 codoni fiecare (codoni sinonimi). Degenerarea codului, respectiv existența mai multor cuvinte cod pentru același aminoacid, se manifestă în special la nivelul nucleotidului 3 din codon. Într-adevăr, este ușor de observat că, în general, primele două baze ale codonilor sinonimi sînt constante. Crick a conchis că asocierea nucleotidelor 1 și 2 din codon cu nucleotidele 3' și 2 din anticodon este fermă, respectînd principiul complementarității A-U și C-G, în timp ce împerecherea nucleotidului 3 din codon cu 1 din anticodon este, în general, laxă. Aceasta s-ar datora particularității nucleotidului 1 (capătul 5') din anticodon de a se împerechea și cu alte nucleotide, încălcînd regulile Watson-Crick (A-U, C-G). De exemplu, în poziția 1 a anticodonului, uracilul se poate lega cu A dar și cu G (slab), iar guanina se poate lega cu C, dar și cu U (slab), din poziția 3 a codonului. Frecvent prezentă ca nucleotidul 1 în anticodon, inozina se poate lega de citozină, dar și de uracil

**Codul genetic**

I	II				III
	U	C	A	G	
U	UUU Phe	UCU	UAU Tyr	UGU Cys	U
	UUG	UCC Ser	UAC	UGC	C
	UUA Leu	UCA	UUA Codon terminator	UGA Codon terminator	A
	UUG	UCG	UAG	UGG Trp	G
C	CUU	CCU	CAU His	CGU	U
	CUC	CCC	CAC	CGC	C
	CUA	CCA	CAA	CGA	A
	CUG	CCG	CAG	CGG	G
A	AUU	ACU	AAU Asn	AGU Ser	U
	AUC Ile	ACG Thr	AAG	AGC	C
	AUA	ACA	AAA	AGA	A
	AUG Met	ACG	AAG Lys	AGG	G
G	GUU	GCU	GAU Asp	GGU	U
	GUC	GCC	GAC	GGC	C
	GUA Val	GCA	GAA	GGA	A
	GUG	GCG	GAG	GGG	G

sau adenina, dar legaturile sunt slabe. Cind insa in pozitia 1 a anticodonului se gaseste C sau A, acestea se pot lega numai dupa regula Watson-Crick cu G, respectiv U din pozitia 3 a codonului, stabilind legaturi ferme.

In pozitia 1 a anticodonului exista deci, in multi ARN, o baza „sovaelnică“, „nedecisa“, „oscilanta“, dispusa sa incalce regulile de complementaritate Watson-Crick (efectul Wobble). Un ARN, continind un astfel de anticodon poate recunoaste si se poate lega la mai multi codoni care specifica aceiasi aminoacid (s-au identificat 32 de tipuri ARN). Cel mai adesea legaturile sunt slabe.

Ratiunea biologica a complexitatii interactiunilor codon-anticodon ar decurge din necesitatea de a asigura atat acuratetea imperecherii, cit si promptitudinea disocierii complexului ARN<sub>t</sub>-ARN<sub>m</sub>, care nu trebuie sa devina



un factor limitant al vitezei procesului de biosinteză a proteinelor. Departe de a fi un semn de imperfecțiune, degenerarea codului minimizează efectele mutațiilor.

De remarcat că trei codoni din cei 64 (UAA, UGA, UAG) nu specifică nici un aminoacid. Acești codoni, denumiți „non sens”, reprezintă de fapt semnale de întrerupere a traducerii  $ARN_m$ . Un lanț polipeptidic, sintetizat pe un anumit  $ARN_m$ , își încetează creșterea stunci cînd citirea  $ARN_m$  a ajuns la un codon non sens.

— Codul genetic nu este ambiguu, niciodată același triplet nu semnifică doi aminoacizi diferiți.

— Codul genetic este universal — toate viețuitoarele utilizează același cod genetic pentru a traduce genele lor specifice în proteine specifice. O abatere surprinzătoare de la universalitate ne relevă codul genetic al mitocondriei. Astfel, codonul AUA corespunde metioninei, și nu izoleucinei, codonul UGA corespunde triptofanului, nefiind un codon non sens, codonii AUA și AUU sînt codoni de inițiere și nu codonii ce specifică izoleucina ș.a.m.d.

## V.2. BIOSINTEZA PROTEINELOR

Edificarea unei macromolecule proteice este, probabil, cel mai complex proces biosintetic ce decurge în lumea vie, implicînd conlucrarea a peste 300 de macromolecule reprezentate de protein enzime, cu funcții distincte în acest proces, și de diverse tipuri de acizi ribonucleici.

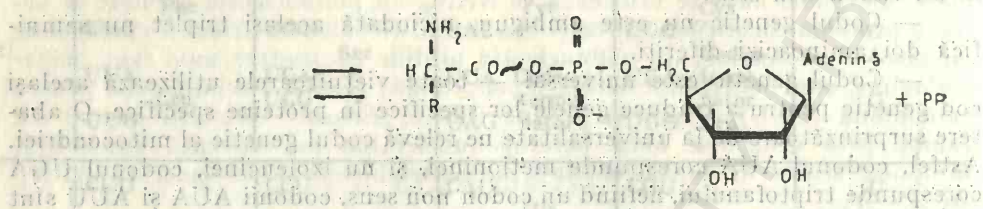
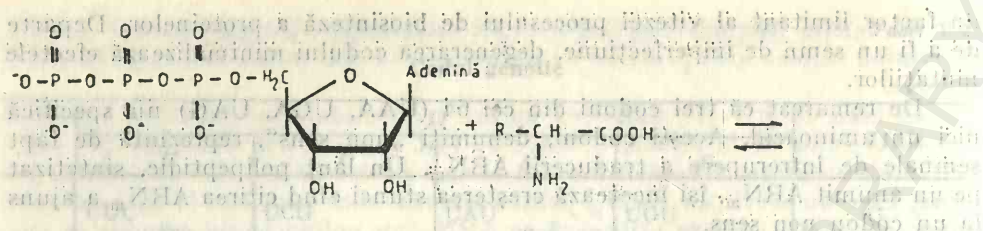
Procesul de biosinteză a proteinelor presupune traducerea limbajului de patru litere al acizilor nucleici (4 nucleotide) în limbaj de 20 de litere (20 de aminoacizi) al proteinelor.

În cadrul transferului de informație, în organismele pro- și eucariote, etapa de biosinteză a proteinelor este desemnată drept etapa de traducere a mesajului genetic înscris în ADN și transcris în  $ARN_m$ . Această etapă decurge la nivelul ribozomilor și se derulează, în principiu, prin adăugarea succesivă a cîte unui reziduu aminoacidic la capătul carboxi terminal în creștere. Atît în cazul procariotelor, cît și în cel al eucariotelor, biosinteza proteinelor implică cinci etape:

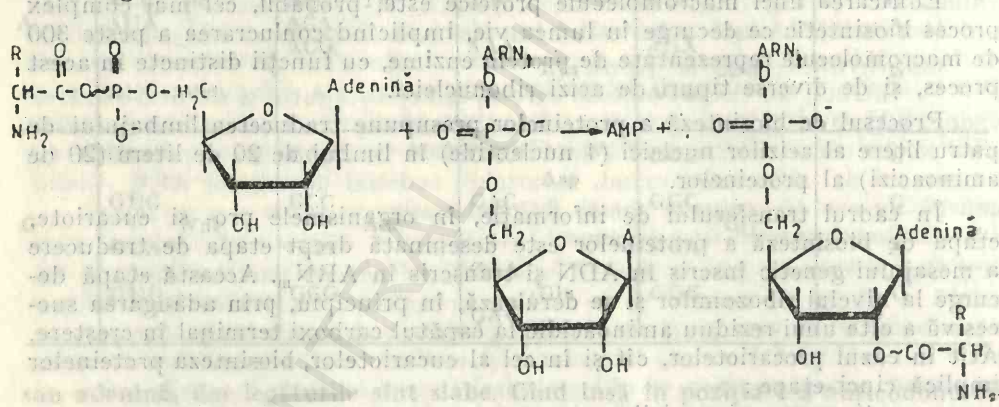
- activarea aminoacizilor
- inițierea lanțului polipeptidic
- elongarea lanțului polipeptidic
- terminarea edificării proteinei și eliberarea sa
- prelucrări posttraducere ale proteinei sintetizate.

### I. Activarea aminoacizilor

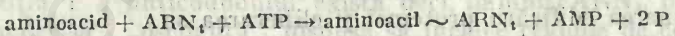
Participarea aminoacizilor la biosinteza legăturii peptidice, care este un proces endergonic, impune activarea prealabilă a acestora. Activarea are loc în urma reacției aminoacidului cu ATP. Se formează complexul aminoacil-AMP, care conține o legătură macroergică de tip anhidridă mixtă, și pirofosfat. Hidroliza ulterioară a pirofosfatului, sub acțiunea pirofosfatazei, deplasează echilibrul spre dreapta, făcînd reacția ireversibilă.



Complexul aminoacil-adenilat cedează restul aminoacid activat unei molecule de ARN<sub>i</sub> specifică aminoacidului dat (al cărui anticodon corespunde codonului ce specifică aminoacidul respectiv), permițându-i ARN<sub>i</sub> să-și exercite funcția de transport și adaptare a aminoacizilor. ARN<sub>i</sub> leagă aminoacidul la capătul CCA și anume la gruparea —OH din poziția 2' sau 3' a nucleotidului adenilic, cu formarea unei legături esterice, în mod excepțional, macroergică.



Reacția globală de activare a aminoacidului poate fi scrisă :



Pentru activarea fiecărui aminoacid se consumă două legături macroergice.

Atât reacția 1 cât și reacția 2 sînt catalizate de ligaze — aminoacil ARN<sub>i</sub> sintetaze, care manifestă o extremă specificitate atât pentru aminoacid cât și pentru ARN<sub>i</sub>, evitîndu-se astfel eroarea legării la un anumit ARN<sub>i</sub> a altui aminoacid decît cel al cărui codon este complementar cu porțiunea anticodon a ARN<sub>i</sub> dat. Pe lîngă locul de legare a ARN<sub>i</sub> și a ATP, enzima este înzestrată



cu încă două locuri, unul pentru legarea aminoacidului, avînd o dimensiune adecvată acestuia și altul, hidrolitic. Dacă un aminoacid ce diferă minim de aminoacidul consacrat se leagă la locul de legare a aminoacidului, enzima recunoaște aminoacidul „împostor” și-l exclude prin hidroliză. De exemplu, dacă în loc de izoleucină se leagă valina, care diferă doar printr-o grupare metilenică de prima, enzima corectează imediat această eroare, expulzînd valina în locul hidrolitic, care are dimensiuni potrivite pentru complexul AMP~valină, nu însă și pentru AMP~izoleucină. Prin hidroliza complexului valil~AMP, valina este eliminată și enzima leagă corect izoleucina.

Fidelitatea procesului de traducere — respectiv adaptarea corectă a aminoacidului pe matricea de ARN<sub>m</sub> și stabilirea secvenței de aminoacizi caracteristică proteinei de sintetizat este, în mare măsură, asigurată de capacitatea de autocontrol a ARN<sub>t</sub> sintetazelor.

## II. Inițierea lanțului polipeptidic

Citirea de către ribozom a ARN<sub>m</sub> se face în direcția 5' → 3' a acestuia, proteina edificîndu-se de la capătul amino-terminal spre cel carboxi-terminal.

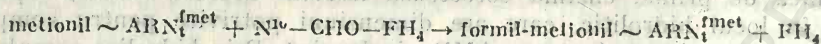
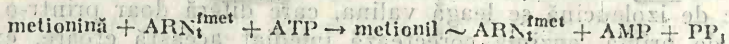
Inițierea presupune ca primă etapă legarea subunității 30 S a ribozomului la ARN<sub>m</sub>. Legarea este mediată de unul dintre cei trei factori de inițiere și anume factorul de inițiere 3 (FI<sub>3</sub>), care are și rolul de a preveni reasocierea prematură a celor două subunități ribozomale. Etapa necesită prezența GTP. Legarea corectă a ribozomului în dreptul codonului de inițiere, ce specifică aminoacidul N-terminal, este esențială pentru citirea corectă a mesajului genetic. La procariote, aminoacidul N-terminal este, invariabil, N-formil-metionina. Acestui aminoacid îi corespunde pe molecula de ARN<sub>m</sub> codonul AUG (uneori și GUG), cel care specifică și metionina neformilată din cuprinsul lanțului polipeptidic. Subunitatea ribozomală 30 S va trebui să discearnă între AUG corespunzînd N-formil metioninei, deci aminoacidului inițiator și AUG corespunzînd celorlalte reziduuri de metionină. Ghidarea corectă a ribozomului la capătul 5' al ARN<sub>m</sub>, în dreptul codonului de inițiere, este posibilă datorită prezenței la capătul 5' al ARN<sub>m</sub> a unei secvențe polinucleotidice (foarte bogată în purine), adiacentă codonului de inițiere, perfect complementară cu o succesiune de nucleotide de la capătul 3'-OH al ARN<sub>t</sub>, 16 S, conținut în subunitatea 30 S. Semnalul de inițiere a traducerii la procariote este deci reprezentat de codonul AUG precedat de secvența nucleotidică descrisă. Afinitatea ribozomului pentru semnalul de inițiere ar modula viteza traducerii, așa cum afinitatea ARN-polimerazei pentru promotor modulează viteza transcrierii.

Așa cum s-a menționat anterior, la procariote, mulți ARN<sub>m</sub> sînt policistronici, codificînd două sau mai multe polipeptide. Pe un astfel de ARN<sub>m</sub> există multiple semnale de inițiere egale numeric cu lanțurile polipeptidice codificate. Ribozomul, alunecînd peste semnalul de terminare a sintezei primului polipeptid (codonul non sens), inițiază, informat fiind de un nou semnal de inițiere, sinteza următorului lanț polipeptidic.

A doua etapă a procesului de inițiere constă în legarea la complexul ARN<sub>m</sub> — subunitate 30 S a N-formil-metionil~ARN<sub>t</sub><sup>met</sup> și a GTP. La această legare colaborează factorii de inițiere 1 și 2 (FI<sub>1</sub> + FI<sub>2</sub>). N-formil-metionil~



$\sim\text{ARN}_i^{\text{met}}$  rezultă prin formilarea metionil  $\sim\text{ARN}_i^{\text{met}}$ , format din  $\text{ARN}_i^{\text{met}}$  și metionină, sub acțiunea metionil  $\sim\text{ARN}_i^{\text{met}}$  sintetazei. Formilarea se efectuează sub acțiunea unei transformilaze avînd ca donator de grupare formil  $\text{N}^{10}$ -formil-tetrahidrofolatul ( $\text{N}^{10}-\text{CHO}-\text{FH}_4$ ):



De subliniat faptul că există două specii diferite de  $\text{ARN}_i$  purtătoare ale metioninei:  $\text{ARN}_i^{\text{met}}$  și  $\text{ARN}_i^{\text{met}}$ , fiecare aptă să lege metionina, generînd metionil  $\text{ARN}_i^{\text{met}}$ , respectiv metionil  $\text{ARN}_i^{\text{met}}$ . Dintre acestea numai metionil  $\text{ARN}_i^{\text{met}}$  este susceptibilă la formilare, generînd aminoacidul inițiator care se va lega la codonul de inițiere, și nu la oricare codon AUG de pe  $\text{ARN}_m$ , în dreptul locusului peptid de pe ribozom, care-l acceptă (fig. V.1).

În cea de-a treia etapă a inițierii, subunitatea ribozomală mare 50 S, se leagă la complexul anterior format, cu eliberarea simultană a factorului de inițiere și hidroliza GTP. Se formează astfel ribozomul funcțional desemnat drept complex de inițiere.

Formil-metionil  $\sim\text{ARN}_i^{\text{met}}$ , legat pe principiul complementarității bazelor la codonul de inițiere, ocupă locusul peptid de pe ribozom (ocupat altfel numai de lanțul polipeptidic în creștere). Locusul aminoacid al ribozomului este deocamdată liber (fig. V.1).

### III. Elongarea lanțului polipeptidic

Procesul constă în adăugarea succesivă de aminoacizi pînă la formarea proteinei de sintetizat.

Adăugarea fiecărui aminoacid parcurge mai multe etape, ce se vor exemplifica pentru aminoacidul 2 din catena polipeptidică.

a. Recunoașterea de către  $\text{ARN}_i$  purtător al aminoacidului doi, a celui de-al doilea codon de pe  $\text{ARN}_m$ . Fixarea corectă a aminoacil- $\text{ARN}_i$  pe locusul aminoacid de pe ribozom este asigurată atît de interacțiunea codon-anticodon cit și de interacțiunile ce se stabilesc între o anumită porțiune a  $\text{ARN}_i$  și locusul aminoacid (A) de pe  $\text{ARN}_m$ . Această etapă a elongării necesită prezența unor factori de elongare și consum de energie sub formă de GTP (fig. V.2).

b. Formarea legăturii peptidice prin transferul restului formil-metionină pe gruparea amino a aminoacil  $\text{ARN}_i$  din locusul aminoacid. Reacția este de fapt o reacție de acilare a grupei amino din aminoacidul 2, catalizată de o peptidil transferază, factorul de elongare G, inclusă în subunitatea 50 S. Locusul peptid este în acest moment ocupat de  $\text{ARN}_i^{\text{met}}$ , iar locusul aminoacid este ocupat, neîntrebuțat, de un  $\text{ARN}_i$  purtător al dipeptidului format (fig. V.2).

Energia necesară formării legăturii peptidice este furnizată de energia eliberată la desfacerea legăturii aminoacid inițiator— $\text{ARN}_i$  corespunzător.

c. Glisarea ribozomului de-a lungul  $\text{ARN}_m$  pe o distanță de un codon spre capătul 3' al  $\text{ARN}_m$ . Simultan are loc hidroliza  $\text{ARN}_i^{\text{met}}$  (fost purtător al aminoacidului 1), cu eliberarea sa în citosol. În acest moment, locusul peptid, ajuns în dreptul codonului 2, este ocupat de  $\text{ARN}_i$  purtător al dipeptidului, iar locusul aminoacid, ajuns în fața codonului 3, este gata să accepte  $\text{ARN}_i$  purtător al aminoacidului 3 (fig. V.2). Această alunecare a ribozo-



mului pe ARN<sub>m</sub>, cu toate evenimentele ce s'întâmplă pentru pornirea de translație. Etapa de translație este catalizată de o translațională suprasubunitate hidroliză unei molecule de GTP. Cu toate acestea, procesul este controlat de existența unor factori de elanare.

Procesul de elongație este un proces ciclic care are loc în două etape: Etapa 1 și Etapa 2.

#### IV. Terminarea sintezei lanțului polipeptidic

Procesul de elongație este un proces ciclic care are loc în două etape: Etapa 1 și Etapa 2. Etapa 1 este caracterizată prin faptul că, odată ce un codon de inițiere (AUG) este legat de un aminoacil-tRNA, se poate începe sinteza lanțului polipeptidic. În Etapa 2, aminoacil-tRNA-ul se transferă la lanțul polipeptidic în curs de dezvoltare, iar tRNA-ul este eliberat pentru a fi reutilizat.

— deslucurarea hidroliză aminoacil-tRNA sub acțiunea factorului de elanare în hidroliză de aminoacil-tRNA.

— eliberarea aminoacil-tRNA purtat de aminoacil-tRNA din lanțul polipeptidic.

— disocierea aminoacil-tRNA de pe ARN<sub>m</sub> și eliberarea aminoacil-tRNA pentru a fi reutilizat.

— degradarea aminoacil-tRNA în aminoacil și tRNA.

— Biosinteza proteinelor este un proces complex care implică o serie de etape, începând cu transcripția și continuând cu translația.

— Biosinteza proteinelor este un proces complex care implică o serie de etape, începând cu transcripția și continuând cu translația.

— Biosinteza proteinelor este un proces complex care implică o serie de etape, începând cu transcripția și continuând cu translația.

— Biosinteza proteinelor este un proces complex care implică o serie de etape, începând cu transcripția și continuând cu translația.

— Biosinteza proteinelor este un proces complex care implică o serie de etape, începând cu transcripția și continuând cu translația.

— Biosinteza proteinelor este un proces complex care implică o serie de etape, începând cu transcripția și continuând cu translația.

— Biosinteza proteinelor este un proces complex care implică o serie de etape, începând cu transcripția și continuând cu translația.

— Biosinteza proteinelor este un proces complex care implică o serie de etape, începând cu transcripția și continuând cu translația.

— Biosinteza proteinelor este un proces complex care implică o serie de etape, începând cu transcripția și continuând cu translația.

— Biosinteza proteinelor este un proces complex care implică o serie de etape, începând cu transcripția și continuând cu translația.

— Biosinteza proteinelor este un proces complex care implică o serie de etape, începând cu transcripția și continuând cu translația.

— Biosinteza proteinelor este un proces complex care implică o serie de etape, începând cu transcripția și continuând cu translația.

— Biosinteza proteinelor este un proces complex care implică o serie de etape, începând cu transcripția și continuând cu translația.

— Biosinteza proteinelor este un proces complex care implică o serie de etape, începând cu transcripția și continuând cu translația.

— Biosinteza proteinelor este un proces complex care implică o serie de etape, începând cu transcripția și continuând cu translația.

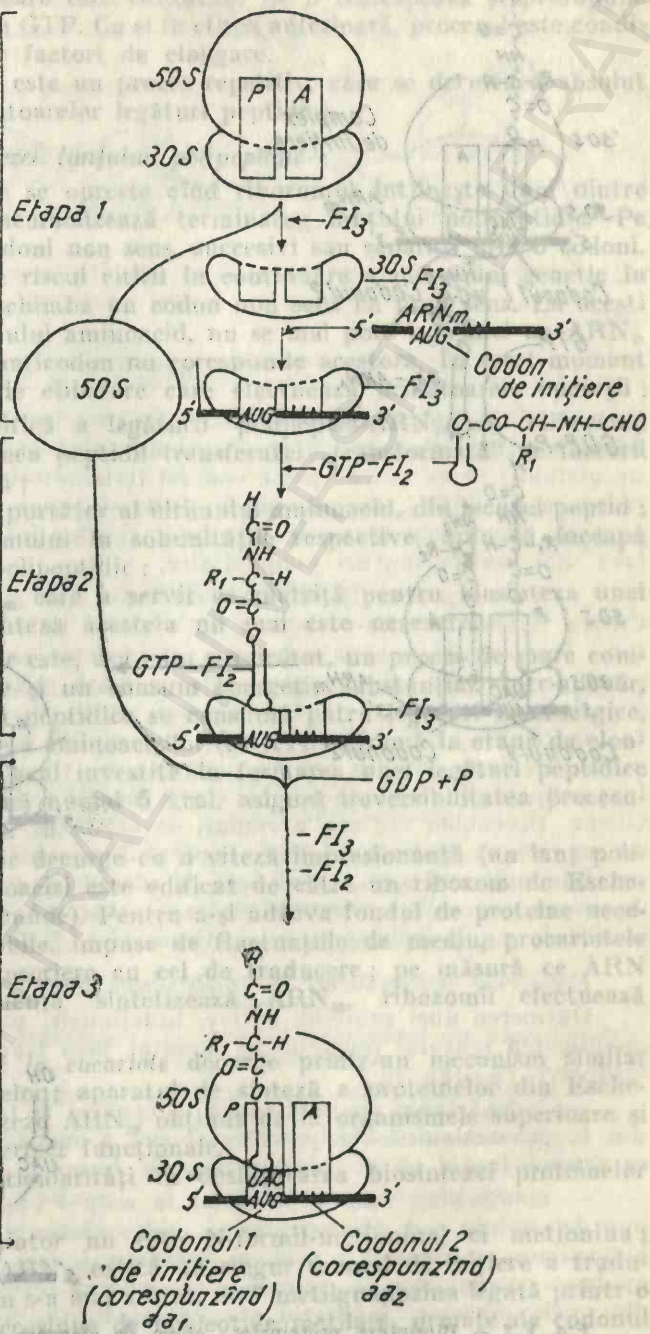


Fig. V.1 — Biosinteza proteinelor; etapa de inițiere a lanțului polipeptidic.

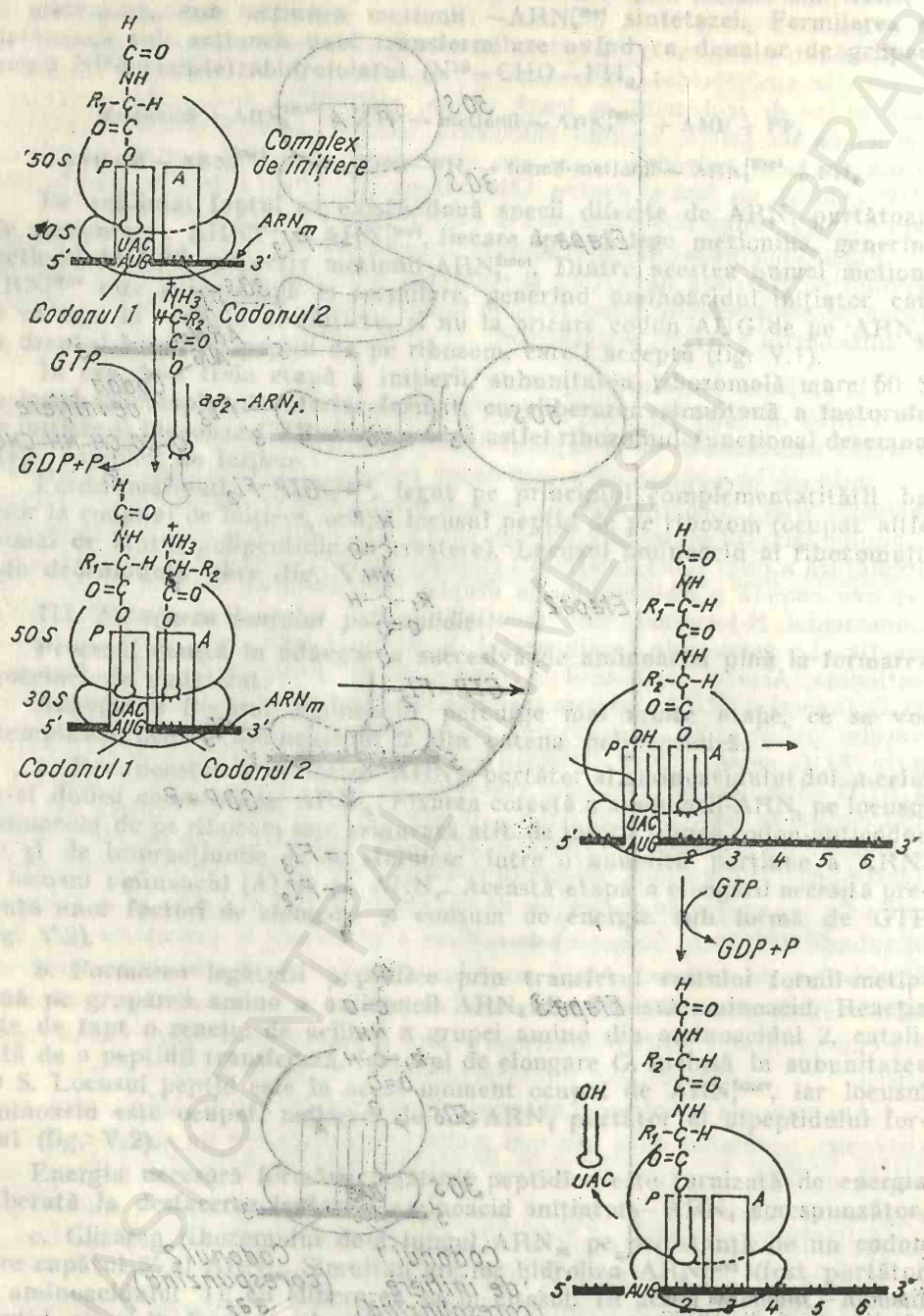


Fig. V.2 — Biosinteza proteinelor: etapa de elongare a lanțului polipeptidic.



mului pe  $ARN_m$ , cu toate evenimentele ce o însoțesc, poartă numele de translocare. Etapa de translocare este catalizată de o translocază și presupune hidroliza unei molecule de GTP. Ca și în etapa anterioară, procesul este condiționat de existența unor factori de elongare.

Procesul de elongare este un proces repetitiv, care se derulează absolut analog la formarea următoarelor legături peptidice.

#### IV. Terminarea sintezei lanțului polipeptidic

Procesul de elongare se oprește când ribozomul întâlnește unul dintre codonii non sens care semnalizează terminarea lanțului polipeptidic. Pe unii  $ARN_m$  există doi codoni non sens, succesivi sau separați prin 5 codoni, probabil pentru a reduce riscul citirii în continuare a mesajului genetic în cazul unei mutații care schimbă un codon non sens cu unul sens. La acești codoni, ajunși în fața locului aminoacid, nu se mai poate lega nici un  $ARN_t$ , întrucât nici o secvență anticodon nu corespunde acestora. În acest moment intervin diverși factori de eliberare care efectuează următoarele operații:

- desfacerea hidrolitică a legăturii polipeptid- $ARN_t$ , cu eliberarea polipeptidului, sub acțiunea peptidil transferazei „transformată” de factorii de eliberare în hidrolază;

- eliberarea  $ARN_t$  purtător al ultimului aminoacid, din locusul peptid;

- disocierea ribozomului în subunitățile respective, apte să înceapă sinteza unui nou lanț polipeptidic;

- degradarea  $ARN_m$  care a servit ca matriță pentru biosinteza unei proteine, atunci când sinteza acesteia nu mai este necesară.

Biosinteza proteinelor este, așa cum s-a arătat, un proces de mare complexitate, care presupune și un consum energetic substanțial. Într-adevăr, la formarea unei legături peptidice se consumă patru legături macroergice, două în etapa de activare a aminoacizilor (ca ATP) și două în etapa de elongare (ca GTP). Cele 29 kcal investite în formarea unei legături peptidice care eliberează la hidroliză numai 5 kcal, asigură ireversibilitatea procesului și, desigur, fidelitatea sa.

Biosinteza proteinelor decurge cu o viteză impresionantă (un lanț polipeptidic de 100 de aminoacizi este edificat de către un ribozom de *Escherichia coli* în numai 5 secunde). Pentru a-și adevăra fondul de proteine necesităților extrem de variabile, impuse de fluctuațiile de mediu, procariotele cuplează procesul de transcriere cu cel de traducere; pe măsură ce  $ARN$  polimeraza-ADN dependentă sintetizează  $ARN_m$ , ribozomii efectuează traducerea acestuia.

Biosinteza proteinelor la eucariote decurge printr-un mecanism similar cu cel propriu procariotelor; aparatul de sinteză a proteinelor din *Escherichia coli* poate să utilizeze  $ARN_m$  obținut de la organisme superioare și să sintetizeze proteine perfect funcționale.

Există și unele particularități în desfășurarea biosintezei proteinelor la eucariote, cum ar fi:

- Aminoacidul inițiator nu este N-formil-metionina, ci metionina;

- Pe molecula de  $ARN_m$  există un singur semnal de inițiere a traducerii, reprezentat, așa cum s-a mai arătat, de 7 metilguanozina legată printr-o legătură trifosfat de o succesiune de nucleotide metilate, urmate de codonul AUG (fig. IV.26). Sinteza proteinelor la eucariote începe cu citirea codonului AUG situat în proximitatea capătului 5' terminal marcat. Nici unul

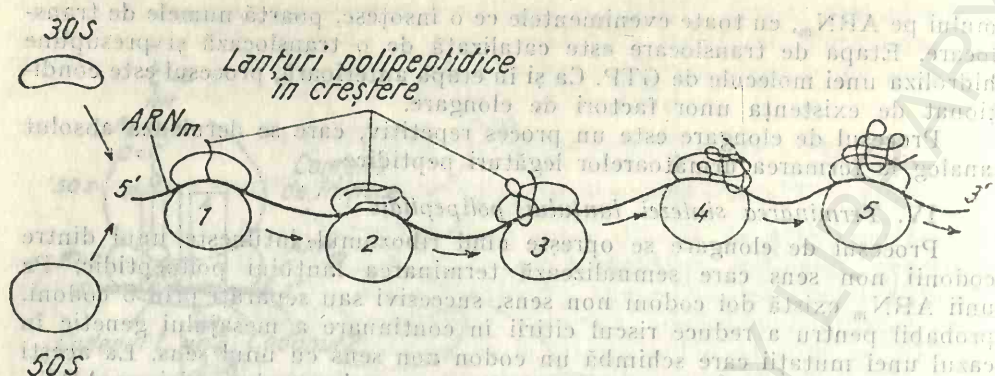


Fig. V.3 — Ilustrarea schematică a unui poliribozom.

dintre ceilalți codoni AUG din ARNm nu vor servi drept codoni de inițiere datorită exigențelor de legare ale ribozomului. Ribozomul eucariot mai are un atribut; el nu „sare“ peste codonii terminatori (ca cel procariot). Ca urmare, pe un ARNm eucariot nu se poate sintetiza decât un singur lanț polipeptidic, chiar când transcriptul primar conține informația cu privire la sinteza mai multor lanțuri polipeptidice.

— Viteza procesului de traducere este mai mare în cazul eucariotelor. Citirea ARNm de către ribozom cu o viteză de 40 de codoni/secundă ar fi total insuficientă pentru eucariote care trebuie să sintetizeze un întreg arsenal de proteine, dintre care unele cu masă moleculară foarte mare. Pentru creșterea eficienței traducerii, mai mulți ribozomi se angajează simultan în citirea ARNm, fiecare dintre ei începând citirea de la capătul 5' terminal. Evident, într-un anumit moment, un ribozom va fi purtătorul unui lanț polipeptidic mai lung sau mai scurt, funcție de momentul în care a început citirea. Ribozomii cei mai apropiați de capătul 5' al ARNm, spre deosebire de cei care au ajuns aproape de capătul 3' terminal, vor purta un lanț polipeptidic mult mai scurt, având încă de „descifrat“ o mare porțiune de ARNm. Asocierea mai multor ribozomi ce traduc sincron aceeași moleculă de ARNm constituie un poliribozom sau polizom (fig. V.3).

#### *Prelucrări posttraducere ale moleculelor proteice*

Obținerea unei proteine native, funcționale, presupune, cel mai adesea, modificarea lanțului polipeptidic rezultat prin traducere. Prelucrările posttraducere constau în:

— îndepărtarea enzimatică de la capătul N.terminal a restului formil din formil-metionină (la procariote) sau a metioninei (la eucariote), ceea ce explică faptul că nu toate proteinele încep cu acești aminoacizi;

— modificarea unor aminoacizi în scopul obținerii celor care nu dispun de cuvinte cod. Hidroxiprolina, hidroxilizina din collagen se obțin prin hidroxilarea enzimatică a prolinei, respectiv lizinei. Cistina se formează prin oxidarea reziduurilor de cisteină. Carboxilarea reziduurilor de acid glutamic din unele proteine, îndeosebi a celor implicate în coagulare, generează 77 carboxiglutamat, excelent chelator al calciului. Reacția este dependentă de vitamina K.



- iodurarea reziduurilor de tirozină ale tireoglobulinei;
- atașarea la lanțul polipeptidic a unor grupări funcționale, de exemplu fosfat, pentru formarea fosfoproteinelor (fosforilarea reziduurilor de serină a unor enzime reglatoare sau a reziduurilor de serină, treonină, tirozină din caseină), glicozil, pentru formarea glicoproteinelor, biotină pentru acetil-CoA carboxilază etc.;
- clivarea unor oligopeptide în cazul unor proteine sintetizate ca precursori. De exemplu, insulina sintetizată ca preprohormon este convertită la hormon numai după îndepărtarea succesivă a unor fragmente polipeptidice (vezi insulina).

Orice proteină, cu o secvență anume de aminoacizi, își dobîndește spontan conformația nativă, care să-i asigure realizarea funcțională.

### *Inhibitori ai sintezei proteinelor*

Numeroase antibiotice și toxine bacteriene se comportă ca inhibitori ai procesului de biosinteză a proteinelor. Inhibirea sintezei proteinelor se poate realiza în orice moment al transferului de informație ADN—ARN—Proteină (Tabel V.2).

Tabel V.2

### **Inhibitori ai sintezei proteinelor**

Compusul	Procesul	Mecanism de acțiune
Mitomicina	Replicare	Impiedică fizic separarea catenelor complementare de ADN.
Acidul nalidixic	Replicare	Inhibă ADN giraza.
Rifampicina	Transcriere	Leagă ARN polimeraza.
Actinomicina D	Transcriere	Se leagă ferm la ADN.
Streptomicina	Traducere	Interferă cu legarea formil metionil ARN <sub>f</sub> met la locul de inițiere.
Cloramfenicol	Traducere	Inhibă peptidil-transferaza.
Tetraciclina	Traducere	Inhibă legarea aminoacil ARN <sub>f</sub> la ribozomi.
Eritromicina	Traducere	Inhibă translocarea prin legare la subunitatea 50 S.
Puronicina	Traducere	Blochează elongarea, substituindu-se unui aminoacil-ARN, în situsul A (este analog structural al extremității 3' al tirozil-ARN <sub>f</sub> ) (Fig. V.).
Neomicina, Kanamicina	Traducere	Erori în citirea codului genetic.
Toxina difterică	Traducere	Inhibă translocarea.

Deși acțiunea compuşilor menționați se manifestă cu precădere în organisme procarote, unele sînt la fel de active și în cele eucariote (puromicina, actinomicina D,  $\alpha$ -amanitina).

### V.3. REGLAREA BIOSINTEZEI PROTEINELOR

Mecanismele care reglează viteza sintezei de proteine au fost studiate în special în cazul procariotelor. Activitatea acestora depinde foarte mult de mediul în care trăiesc, de fluctuațiile în concentrația substanțelor nutritive pe care le utilizează. Procariotele au abilitatea de a-și adecva echipamentul enzimatic la natura surselor de azot sau carbon ce li se oferă; ele dispun de două tipuri de enzime:

a. enzime inductibile;

b. enzime represibile.

a. Enzimele inductibile sînt acelea a căror concentrație depinde de prezența sau absența din mediu a unui compus denumit inductor. În general, enzimele inductibile sînt implicate în căi catabolice. În mod normal, cantitatea de enzime inductibile în celulă este foarte mică dar ea poate crește spectaculos atunci cînd apare necesitatea utilizării substratului enzimei respective, substrat care se comportă ca inductor.

Un astfel de exemplu este  $\beta$ -galactozidaza, enzimă care catalizează hidroliza lactozei și care este prezentă într-un număr minim de exemplare în condițiile în care bacteria are la dispoziție alte surse de carbon, de preferință glucoză, dar care, în condițiile în care lactoza devine sursa exclusivă de carbon, deci de energie, este sintetizată în mii de exemplare. Organizată pe principiul maximei economii, bacteria investește aminoacizi și energie pentru sinteza enzimei numai atunci cînd aceasta devine imperios necesară. Transferarea bacteriei pe un mediu conținînd glucoză determină sistarea sintezei  $\beta$ -galactozidazei. Lactoza se comportă deci ca inductor al sintezei enzimei ce o catabolizează. Utilizarea lactozei presupune participarea a încă două enzime și anume: o permează, care facilitează transportul  $\beta$ -galactozidului în interiorul celulei, și o transacetilază, a cărei funcție n-a fost încă precizată. Lactoza induce sinteza nu numai a galactozidazei ci și a celorlalte două enzime. Inducția prin lactoză este deci coordonată, referindu-se la toate enzimele implicate în utilizarea sa.

b. Enzime represibile sînt acelea a căror concentrație depinde de prezența sau absența din mediu a unui compus denumit corepresor. În general, enzimele represibile sînt implicate în căi anabolice.

O bacterie care crește pe un mediu conținînd surse de azot și carbon este aptă să realizeze sinteza tuturor celor 20 de aminoacizi. Dacă în mediu se adaugă unul — oricare dintre acești aminoacizi, bacteria încetează să producă enzimele implicate în biosinteza aminoacidului respectiv. Aminoacidul adăugat produce represia sintezei tuturor enzimelor implicate în biosinteza sa. Represia prin produsul final al unei căi anabolice este deci o represie coordonată.

Explicarea în termeni moleculari a proceselor de inducție și represie enzimatică se datorează lucrărilor lui Jacob și Monod. În 1961, aceștia elaborează modelul privind reglarea biosintezei proteinelor la procariote, reglare ce se efectuează la nivelul transcrierii, deci a sintezei  $ARN_m$ .

Modelul Jacob-Monod de reglare a biosintezei proteinelor poartă numele de teoria operonului și s-a bazat, în principiu, pe studiul reglării metabolismului lactozei în *Escherichia coli*. Ei au postulat că genele structurale ce conțin informația cu privire la biosinteza  $\beta$ -galactozidazei, permeazei.



transacetilazei (desemnate  $z$ ,  $y$ ,  $x$ ) sînt adiacente în genom și că viteza sintezei celor trei enzime este guvernată de un fragment de ADN denumit genă reglatoare. Pe această genă reglatoare se edifică un  $ARN_m$  ce conține informația pentru sinteza unei proteine denumită represor. Acest represor, o proteină alosterică, se leagă la un fragment de ADN, desemnat drept operator, care este adiacent la genele structurale, a căror transcriere o controlează și împreună cu care formează un operon (operonul lac). Genele structurale ale operonului pot fi transcrise atîta timp cît operatorul este liber. Legarea represorului la operator blochează accesul ARN polimerazei la locusul promotor, avînd ca rezultat suprimarea transcrierii genelor structurale interesante în metabolizarea lactozei.

Ce se întîmplă însă în prezența lactozei, care, așa cum am văzut, se comportă ca inductor, declanșînd sinteza celor trei enzime ce o catabolizează? Jacob și Monod admit că inductorul se leagă specific la represorul atașat la operator și, inducînd o tranziție alosterică, îl convertește la o conformație cu afinitate redusă pentru operator; ca urmare are loc desprinderea acestuia de pe operator. În această situație, ARN polimeraza se leagă nestînjinită la locusul promotor, inițiînd transcrierea genelor structurale, respectiv sinteza unui  $ARN_m$  policistronic pe care se vor edifica cele trei enzime ce catabolizează lactoza (fig. V.4). Inductorul realizează deci derepresia operonului și permite declanșarea proceselor de transcriere și traducere subsecvente. Moleculele de represor libere pot lega și ele molecule de inductor, ceea ce le convertește la forme inapte să se lege la operator.

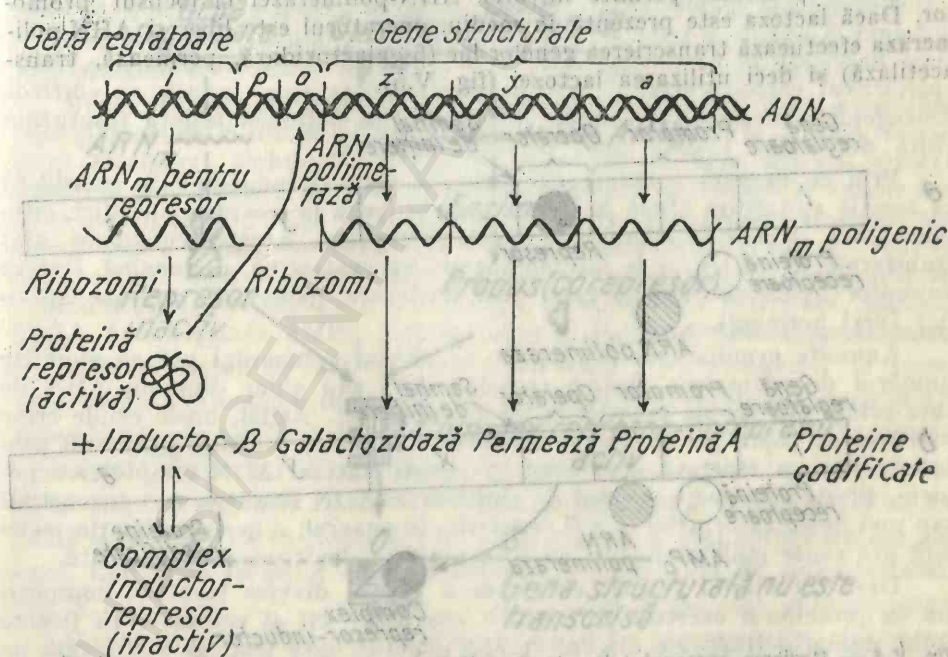


Fig. V.4 — Ilustrarea mecanismului de reglare a biosintezei proteinelor prin inducție.

Abilitatea represorului de a se lega reversibil și exclusiv la operator sau inductor este responsabilă atât de represiia sistemului  $\beta$ -galactozidază cât și de derepresiia (inducția) sa.

O întrebare pare inevitabilă: ce se întâmplă dacă bacteria (*E. coli*) dispune simultan de glucoză și lactoză? Se va comporta lactoza ca inductor, împiedicând acțiunea represorului și deci permițind transcrierea genelor lac și ulterioara lor traducere? Strategia bacteriei este alta; ea crește pe seama glucozei și numai atunci când concentrația acesteia atinge valori minime începe să utilizeze lactoza. Metabolizarea simultană a glucozei, combustibil preferat al *E. coli*, și a lactozei sînt excluse; bacteria nu consumă energie pentru sinteza enzimelor operonului lactoză (operonul lac) atîta timp cît dispune de glucoză (represiie prin catabolit). Cum „simte” bacteria prezența glucozei în mediu și cum se comută activitatea ei pe utilizarea lactozei cînd concentrația glucozei scade? Răspunsul s-a conturat ca urmare a următoarelor constatări:

— Adenozin monofosfatul ciclic ( $AMP_c$ ), format din ATP sub acțiunea adenilatciclazei și hidrolizat de fosfodiesterază, reprezintă semnalul de foame a bacteriei („hunger signal”), de lipsă a glucozei, combustibilul ei preferat.  $AMP_c$  se leagă la o proteină receptoare specifică (proteina receptoare a  $AMP_c = P.R_{AMP_c}$ ), formînd complexul  $AMP_c - P.R_{AMP_c}$ , apt să se lege pe un locus specific din regiunea promotor. Prezența complexului în acest locus favorizează accesul și legarea ARN-polimerazei la promotor (locusul promotor se suprapune parțial peste locusul operator).

— În lipsa glucozei sau la concentrații mici ale acesteia, concentrația  $AMP_c$  este mare; formarea complexelor cu proteina receptoare și legarea acesteia la promotor permite intrarea ARN-polimerazei la locusul promotor. Dacă lactoza este prezentă în mediu, operatorul este liber și ARN-polimeraza efectuează transcrierea genelor lac ( $\beta$ -galactozidază, permează, trans-acetilază) și deci utilizarea lactozei (fig. V.5).

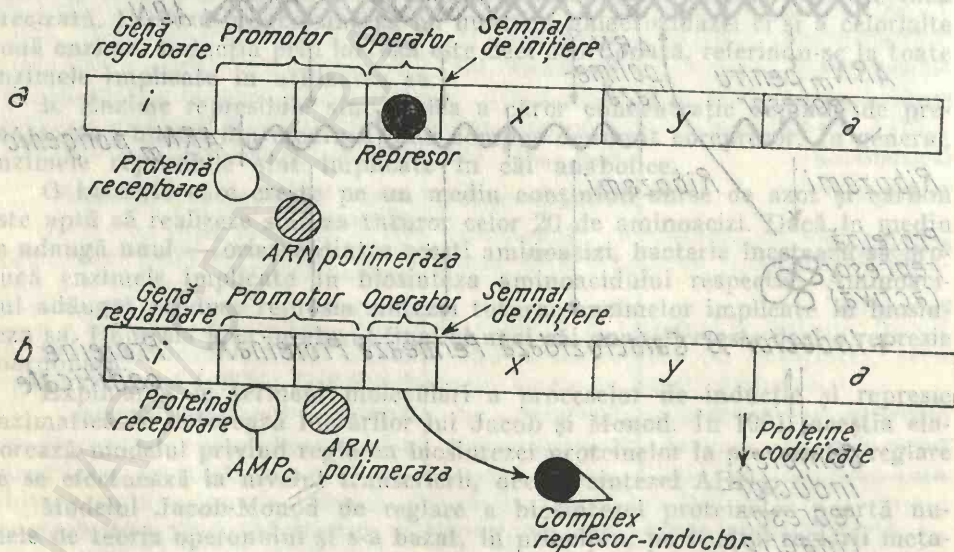


Fig. V.5 — Reglarea operonului lac. la *E. coli* într-un mediu conținînd glucoză (a) sau lactoză (b).



Atunci cînd concentrația glucozei este mare, concentrația  $AMP_c$  este redusă și, prin absența complexului  $AMP_c-PR_{AMP_c}$ , ARN-polimeraza nu se leagă la promotor și genele lac nu sînt transcrise, fie că există lactoză, fie că nu, deci indiferent dacă operatorul este sau nu ocupat de represor.

Complexul  $AMP_c-PR_{AMP_c}$ , spre deosebire de represor, exercită un efect pozitiv în exprimarea operonului lac. Această dublă modalitate de reglare întîlnită la numeroase bacterii, și vizînd diverși operoni, conferă acestor organisme o mare flexibilitate metabolică, permițîndu-le să-și rezolve problemele de adaptare la mediu nutrițional ce li se oferă la un moment dat.

Teoria operonului oferă o explicație și fenomenului de represie prin produs final a biosintezei enzimelor. Genele implicate în biosinteza histidinei — de exemplu — încetează să se mai exprime în situația în care sinteza histidinei în celulă depășește utilizarea sa și ca urmare aminoacidul se acumulează în mediu. În absența histidinei, represorul sintetizat de către gena reglatoare a operonului his, este inapt să se lege la operator. La concentrații mari de histidină însă, aceasta se leagă la represor și induce o tranziție conformațională ce favorizează legarea sa la operator. Histidina se comportă ca un corepresor reușind să sisteze transcrierea genelor ce codifică enzimele implicate în propria sa sinteză. Are loc astfel represia coordonată prin produs final (fig. V.6). Îndepărtarea histidinei din mediu, respectiv utilizarea sa, produce derepresia transcrierii și deci apariția enzimelor ce o sintetizează.

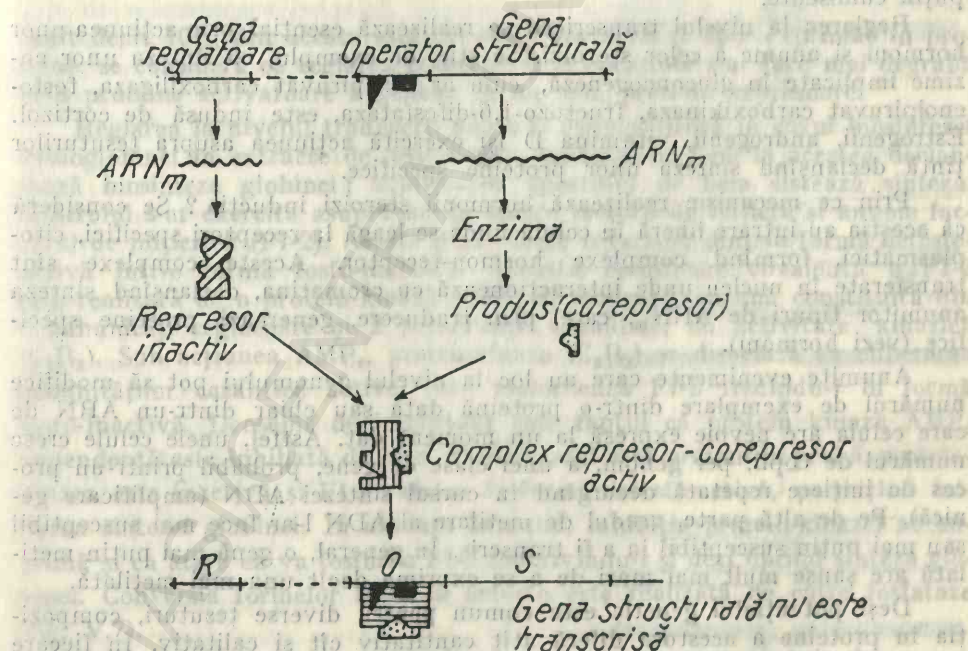


Fig. V.6 — Ilustrarea mecanismului de reglare a biosintezei proteinelor prin represie.

În termeni generali, modelul Jacob-Monod admite existența unei gene reglatoare care controlează exprimarea anumitor gene structurale prin intermediul unei proteine, a cărei sinteză o specifică, denumită represor. Acest represor poate fi activ sau inactiv. Activarea represorului suprimă sinteza de  $ARN_m$ , deci de proteine, în timp ce inactivarea sa permite transcrierea genelor structurale controlate și sinteza proteinelor respective.

În cazul enzimelor inductibile, represorul este activ în mod normal și genele structurale sînt represate. Cînd în mediu apare inductorul, represorul este inactivat de către acesta, ceea ce duce la derepresia genelor, deci la sinteza enzimei respective.

În cazul enzimelor represibile, represorul este inactiv în mod normal și genele structurale se exprimă, ducînd la sinteza unui anumit component celular. Cînd în mediu se acumulează produsul final al căii anabolice respective, care se comportă drept corepresor, represorul este activat prin formarea complexului represor-corepresor, producîndu-se represia genelor structurale și deci sistarea sintezei enzimelor implicate în sinteza metabolismului celular terminal.

Ipoteza Jacob-Monod și-a dovedit validitatea în cazul a nenumărate sisteme enzimatice. Ea a permis interpretarea acțiunii unor compuși endo- sau exogeni (medicamente, hormoni) prin mecanisme de inducție și represie enzimatică, contribuind totodată la descifrarea unor mecanisme patologice.

Pe lângă tipul de reglare descris, bacteriile dispun și de alte mecanisme de control al biosintezei proteinelor, care le asigură supraviețuirea.

La eucariote, reglarea sintezei proteinelor se realizează atît la nivelul transcrierii cît și la nivelul traducerii. Mecanismele reglării la eucariote sînt puțin cunoscute.

Reglarea la nivelul transcrierii se realizează esențial prin acțiunea unor hormoni și anume a celor steroizi. Se știe, de exemplu, că sinteza unor enzime implicate în gluconeogeneză, cum ar fi: piruvat carboxilgaza, fosfoenolpiruvat carboxikinaza, fructozo-1,6-difosfataza, este indusă de cortizol. Estrogenii, androgenii, vitamina D își exercită acțiunea asupra țesuturilor țintă declanșînd sinteza unor proteine specifice.

Prin ce mecanism realizează hormonii steroizi inducția? Se consideră că aceștia au intrare liberă în celulă unde se leagă la receptori specifici, citoplasmatici, formînd complexe hormon-receptor. Aceste complexe sînt transferate în nucleu unde interacționează cu cromatina, declanșînd sinteza anumitor tipuri de  $ARN_m$ , care, prin traducere, generează proteine specifice (vezi hormoni).

Anumite evenimente care au loc la nivelul genomului pot să modifice numărul de exemplare dintr-o proteină dată sau chiar dintr-un  $ARN$  de care celula are nevoie expresă la un moment dat. Astfel, unele celule cresc numărul de copii, per genom, a unei clase de gene, probabil printr-un proces de inițiere repetată decurgînd în cursul sintezei ADN (amplificare genică). Pe de altă parte, gradul de metilare al ADN l-ar face mai susceptibil sau mai puțin susceptibil la a fi transcris. În general, o genă mai puțin metilată are șanse mult mai mari de a se exprima decît una mai metilată.

Deși potențialul genetic este comun pentru diverse țesuturi, compoziția în proteine a acestora diferă atît cantitativ cît și calitativ. În fiecare țesut numai o fracțiune din informația genetică este tradusă sub formă de proteine. Ținînd seama de mărimea genomului eucariot și de faptul că nu mai



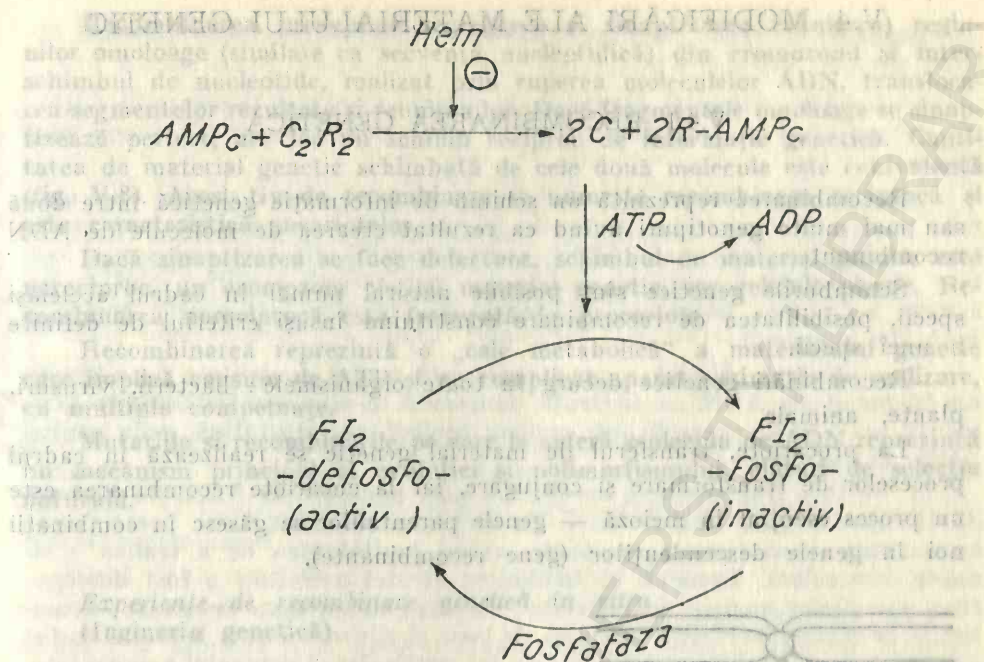


Fig. V.7 — Reglarea biosintezei globinei prin fosforilare reversibilă a FI2.

mult decât 10% din acesta este vreodată transcris și apoi exprimat în proteine, se consideră că reglarea transcrierii la eucariote s-ar face mai degrabă prin proteine activatoare a genelor și nu prin proteine represoare.

Reglarea la nivelul traducerii poate fi exemplificată în cazul biosintezei hemoglobinei în extracte de reticulocite. Adăosul de hem la acestea declanșează biosinteza globinei; suprimarea aportului de hem sisteză sinteza. Controlul s-ar exercita asupra unuia dintre factorii de inițiere și anume factorul de inițiere-2 (FI-2). Acesta poate trece reversibil dintr-o formă defosfo-activă într-o formă fosfo-inactivă. Această modificare covalentă a FI-2 este realizată de o protein-kinază AMP<sub>c</sub> dependentă, enzimă constituită din 2 subunități reglatoare și 2 subunități catalitice, cu activitate kinazică (C<sub>2</sub>R<sub>2</sub>). Sub acțiunea AMP<sub>c</sub>, proteinkinaza (C<sub>2</sub>R<sub>2</sub>) se disociază cu eliberarea subunităților catalitice active, care fosforilează FI-2 trecându-l în formă fosfo-inactivă. Deosebit de important este faptul că protein-kinaza AMP<sub>c</sub> dependentă este inhibată de hem. Dacă hemul este prezent în probă, proteinkinaza este inactivă și FI-2 rămâne în formă defosfo-activă, permițând inițierea sintezei globinei. În absența hemului, inhibiția protein-kinazei se suprimă și ea atare ea va fosforila FI-2 inactivându-l și deci oprind sinteza globinei. Conversia formelor fosfo la defosfo este realizată de către fosfataze (fig. V.7).

Reglarea biosintezei proteinelor la eucariote presupune și alte mecanisme, a căror bază moleculară este încă neclarificată.

## V.4. MODIFICĂRI ALE MATERIALULUI GENETIC

### V.4.1. RECOMBINAREA GENETICĂ

Recombinarea reprezintă un schimb de informație genetică între două sau mai multe genotipuri avînd ca rezultat crearea de molecule de ADN recombinant.

Schimbările genetice sînt posibile natural numai în cadrul aceleiași specii, posibilitatea de recombinare constituind însuși criteriul de definire a unei specii.

Recombinări genetice decurg în toate organismele : bacterii, virusuri, plante, animale.

La procariote, transferul de material genetic se realizează în cadrul proceselor de transformare și conjugare, iar la eucariote recombinarea este un proces esențial în meioză — genele parentalilor se găsesc în combinații noi în genele descendenților (gene recombinante).

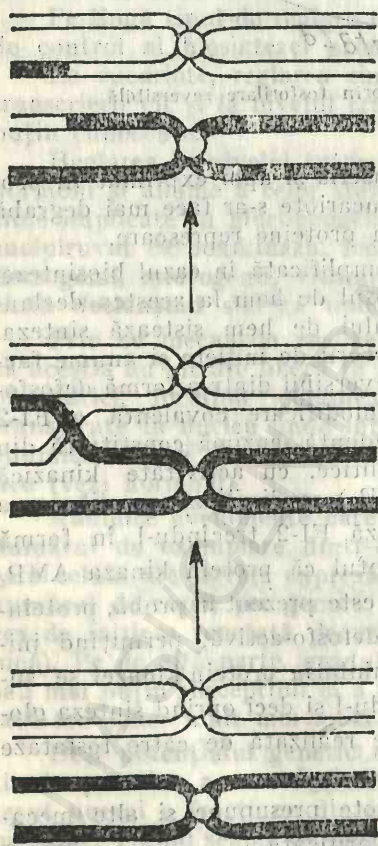


Fig. V.8 — Recombinarea reciprocă a ADN.



Recombinarea presupune segregarea și sinaptizarea (alinieră) regiunilor omoloage (similare ca secvență nucleotidică) din cromozomi și interschimbul de nucleotide, realizat prin ruperea moleculelor ADN, translocarea segmentelor rezultate și reunirea lor. Dacă fragmentele omoloage se sinaptizează perfect, are loc un schimb reciproc de informație genetică. Cantitatea de material genetic schimbată de cele două molecule este echivalentă (fig. V.8). Acest tip de recombinare se numește recombinare reciprocă și este caracteristică eucariotelor.

Dacă sinaptizarea se face defectuos, schimbul de material genetic este nereciproc, un cromozom câștigă material genetic, iar celălalt pierde. Recombinarea nereciprocă este frecventă la procariote.

Recombinarea reprezintă o „cale metabolică” a materialului genetic care implică consum de ATP și un complicat aparat enzimatic de realizare, cu multiple competențe.

Mutațiile și recombinările pe care le suferă molecula de ADN reprezintă un mecanism principal al evoluției și polimorfismului, alături de selecția naturală.

**Experiențe de recombinare genetică in vitro.**  
(Ingenieria genetică)

Posibilitatea de recombinare genetică între specii a apărut întotdeauna geneticianului ca tentantă și s-a anticipat ca avantajoasă. Experiențele de recombinare genetică, respectiv de manipulare a genelor, presupun introducerea în genomul unui organism a unor gene care nu figurează în patrimoniul ereditar al acestuia, cu obținerea unor molecule hibride (himerice), recombinante.

Experiențele de inginerie genetică au vizat includerea unor gene de proveniență animală sau vegetală într-un vector potrivit (o moleculă de ADN) care să le introducă într-o celulă în care să li se permită replicarea și exprimarea fenotipică.

În organismul gazdă, gena se replică în ritmul ADN vector, astfel încât pot fi obținute cantități mari din gena inserată, necesare studiilor fundamentale de genetică (secvențializare, expresie, localizare în genom). Dacă genei i se permite să se exprime, se obține proteina codificată de genă, proteină care nu face parte din repertoriul celulei, dar a cărei obținere în cantități mari reprezintă adesea însuși scopul experienței genetice.

Ca molecule vector se utilizează cel mai adesea plasmidele. Ele sînt instrumente ideale ale tehnologiei ADN recombinat, intrucit însumează calități importante cum ar fi:

- se izolează ușor și rezistă manipulărilor;
- sînt molecule mici care trec ușor prin membrana celulei gazdă;
- se replică autonom și rapid, independent de cromozom, ceea ce permite „amplificarea genei” (fragmentului de ADN) inclus;
- prezintă gene marker care, exprimate fenotipic, le conferă caracteristici ce permit selecționarea celulelor transformate (cel mai adesea gene de rezistență la antibiotice).

Fragmentul ADN (gena) ce urmează a fi inserat în vector poate fi obținut pe mai multe căi:

1. — Prin sinteza de ADN complementar (ADN<sub>c</sub>) pe template de ARN<sub>m</sub> sub acțiunea revers transcriptazei (vezi revers transcrierea) în sisteme aceluare.

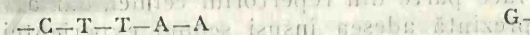
ARN mesager matur, care va folosi ca matriță pentru sinteza unei anumite gene, se izolează din țesuturile în care gena a cărei sinteză se urmărește se exprimă maximal: ARN<sub>m</sub> pentru insulină din pancreas sau și mai bine din insulinoame (tumori pancreatice care secretă cantități mari de insulină), cel pentru hormonul de creștere din hipofiză, cel pentru hemoglobină din eritrocite.

2. — Sinteza chimică a genei reprezintă o altă modalitate de a obține un fragment de ADN cu secvență cunoscută. S-au sintetizat chimic gene relativ mici, ca de exemplu cele pentru insulină, somatostatina, gena pentru ARN<sub>t</sub> al tirozinei.

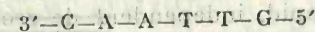
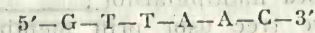
3. — Prin fragmentarea specifică a unei molecule de ADN. Se clivează ADN donor al genei, ca și ADN din vector, astfel încât să se poată forma extremități monocatenare omoloage, având posibilitatea de a realiza o sinapsă moleculară. Decisivă în împlinirea acestei necesități a fost descoperirea așa-ziselor enzime de restricție. Aceste endonucleaze recunosc în molecula de ADN o secvență anumită de baze și clivează ete o legătură fosfat diesterică de pe ambele catene, într-un loc particular al secvenței recunoscute. Unele enzime de restricție „taie” moleculele de ADN bicatenar, decalat, producând segmente purtătoare de extremități monocatenare coezive (conținând nucleotide complementare) ce permit sinapsa fragmentelor, altfel, neomoloage. Astfel, restrictaza Eco R-I, izolată din *Escherichia coli*, recunoaște secvența 5' GAATTC 3' și „taie” între G și A. Secvența de pe cealaltă catenă 3' CTTAAG 5' va fi tăiată tot între G și A. Evident, rezultă fragmente de ADN cu capete monocatenare complementare:



Eco R I



Alte endonucleaze de restricție taie ADN bicatenar formând capete drepte, necoezive (de ex. Hpa I obținută din bacteria *Hemophilus parainfluenzae*):



Hpa I

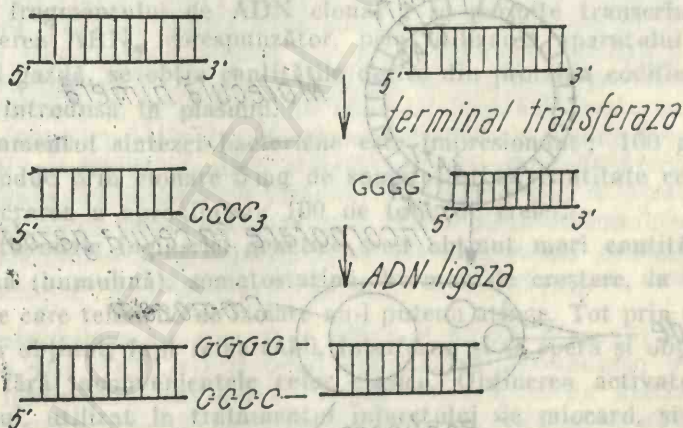




Dacă pe o moleculă de ADN există mai multe situsuri de recunoaștere pentru o restrictază, aceasta va genera mai multe fragmente de ADN. Cu cât secvența recunoscută de enzima de restricție este mai lungă, cu atât fragmentele de ADN obținute sînt mai lungi. De exemplu, Eco RI, care recunoaște o secvență de 6 nucleotide, taie fragmente de 10—20 000 nucleotide, care pot să corespundă la una sau mai multe gene. Fragmentele obținute prin acțiunea mai multor enzime de restricție pot fi adesea unigenice; ele pot fi separate prin diferite metode, obținându-se gene individuale. Se pot constitui plasmide în care s-au inserat totalitatea secvențelor unui genom (bănci de gene). Funcție de enzimele de restricție utilizate, numărul de clone necesar pentru a acoperi totalitatea fragmentelor unui genom este variabil.

Dacă atât ADN donor al unei gene, cât și plasmidul vector sînt clivați de aceeași restrictază, de exemplu Eco RI, este posibilă inserția genei în plasmid prin împerecherea nucleotidelor de la nivelul capetelor coezive (fig. V.9). O ligază stabilește legături fosfat diesterice sudînd plasmidul devenit recombinant.

Dacă două molecule de ADN ce provin de la specii diferite nu conțin capete coezive, se recurge la adăugarea de secvențe monocatenare complementare la capetele celor două molecule. Enzima dezoxinucleotidil transferaza, denumită și terminal transferaza, are abilitatea de a adăuga la capetele 3'—OH ale celor două molecule ce trebuie sudate cozi homopolimerice complementare, de exemplu polidezoxicitidina pe o moleculă și polidezoguanozina pe cealaltă :



De remarcat că terminal transferaza nu reclamă o catenă ADN matriceă.

După „confectionarea” moleculei recombinante de ADN urmează introducerea sa în celula gazdă, care devine, astfel, o celulă transformată genetic. Această operație se realizează prin permeabilizarea membranelor celulare cu  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  (fig. V.9).

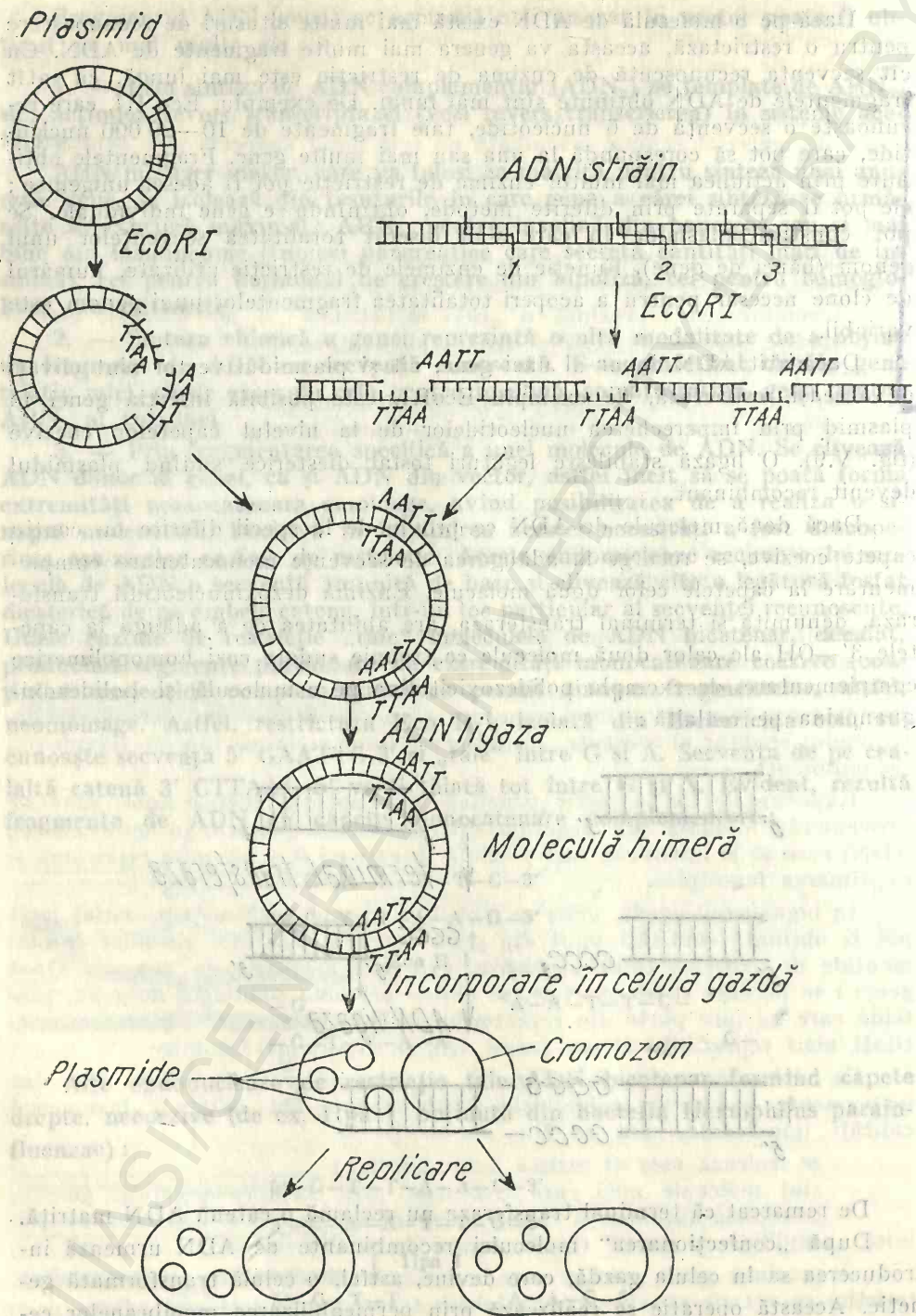


Fig. V.9 — Etapele clonării unui fragment de ADN într-un plasmid.



Numărul de celule bacteriene care preiau molecula himeră este mic, ceea ce obligă la detectarea și selectarea exclusiv a acestora. Problema este deosebit de complicată atunci când se urmărește selecționarea celulelor ce conțin un plasmid, purtător al unei gene particulare, dintr-un amestec de celule conținând plasmide purtătoare de fragmente ADN diferite, rezultate din acțiunea unor restricțaze asupra ADN heterolog (străin). Într-adevăr, complicația rezultă din numărul mare de secvențe necodificatoare din molecula de ADN eucariot. Mai puțin complicată este situația în care se introduce în plasmide copii de ADN, obținute prin acțiunea revers transcrip-tazei, ale tuturor ARN<sub>m</sub> citoplasmatici și se urmărește selectarea coloniilor bacteriene ce conțin o anumită copie ADN. În acest caz, selecția clonelor dorite se face prin metode imuno-chimice sau genetice. Dacă se permite exprimarea ADN (transcrierea, urmată de traducerea ARN<sub>m</sub>), se poate recurge la o reperare imunologică a clonelor ce conțin o anumită genă. Se utilizează anticorpi marcați la proteina corespunzătoare genei și se identifică autoradiografie complexul antigen-anticorp format.

Alternativ, în situația în care se cunoaște secvența aminoacizilor dintr-o proteină dată, se sintetizează chimic un oligonucleotid marcat, care va hibrida exclusiv cu copia ADN corespunzătoare acelei proteine, fapt ce va permite identificarea clonelor bacteriene conținând ADN căutat.

În coloniile bacteriene selecționate, plasmidul se replică autonom, independent de cromozom, cu o viteză foarte mare. Genă eucariotă va fi și ea „amplificată“, găsiindu-se în copii numeroase în celulă.

ADN heterolog se poate extrage din celula bacteriană dacă plasmidul ce-l încorporează va fi tăiat de aceeași endonuclează de restricție care l-a generat. Se obțin astfel cantități mari de fragmente specifice de ADN utilizate în cercetări fundamentale și aplicative de genetică.

Dacă fragmentului de ADN clonat i se permite transcrierea urmată de traducerea ARN<sub>m</sub> corespunzător, prin utilizarea aparatului de sinteză a bacteriei gazdă, se obțin cantitățile dorite din proteina codificată de gena eucariotă introdusă în plasmid.

Randamentul sintezei bacteriene este impresionant: 100 g celule de *E. coli* produc prin clonare 5 mg de somatostatină, cantitate ce se obținea prin prelucrarea a aproximativ 100 de tone de creier.

Prin tehnicile ingineriei genetice s-au obținut mari cantități de insulină umană (humulină), somatostatină, hormon de creștere, la un grad de puritate pe care tehnicile de izolare nu-l puteau atinge. Tot prin sinteză bacteriană s-a obținut, fapt remarcabil, interferon și se speră și obținerea unor vaccinuri fără inconvenientele celor clasice. Obținerea activatorului plasmínogenului, utilizat în tratamentul infarctului de miocard, și a antitripsinei (inhibitor al elastazei), utilizată în tratarea emfizemului pulmonar, se numără printre succesele tehnologiei ADN recombinant.

Tehnica clonării genelor a rezolvat probleme de terapie medicală strîngente (tratamentul diabetului insulino-dependent, a nanismului hipofizar etc.), a permis modificarea genetică a unor plante superioare (transfer de gene avînd ca rezultat creșterea eficienței fotosintezei și a rezistenței la di-

ferite condiții de mediu), a produs bacterii specializate în degradarea unor poluanți etc. Amplificarea genelor, prin clonare în bacterii, a permis succese remarcabile în genetică (secvențializarea genelor, determinarea structurii cromozomilor la eucariote, mecanisme de control în exprimarea genelor). Se anticipează utilizarea rezultatelor clonării genelor în corectarea unor defecte metabolice înăscute, prin transformarea genetică a unor celule somatice.

Este de sperat că manipularea genetică a microorganismelor va fi practică exclusiv în serviciul existenței, în spiritul celei mai profunde și înalțabile bioetici.

### *Determinarea secvenței nucleotidelor în oligonucleotide*

Clonarea genelor a permis obținerea în cantități mari a unor polinucleotide (fragmente de ADN), ce pot fi prelucrate și analizate, în vederea stabilirii secvenței nucleotidelor. Maxam și Gilbert au stabilit o metodă chimică simplă și ingenioasă, care are ca principiu fragmentarea ADN și separarea electroforetică a fragmentelor rezultate, funcție de mărimea lor și independent de natura bazelor, urmată de identificarea acestora. Simplificând, etapele s-ar succeda astfel:

1. Se marchează unul dintre capetele ADN clonat cu  $P^{32}$ .
2. Se separă cele două catene și se izolează populația omogenă, constituită din aceeași monocatenă.
3. Se prepară 4 probe din ADN monocatenar marcat la capătul 5' (de exemplu) și fiecare dintre ele se supune acțiunii a câte unui reactiv care distruge selectiv una din cele 4 baze. Să admitem că oligonucleotidul marcat la capătul 5' este:  $G^*CTCGTCAA$  și că în proba 1 este excizată timina, într-a doua citozina, în cea de-a treia guanina și în ultima adenina. Prin excizia în proba 1 a timinei, oligonucleotidul este scindat în fragmente de diferite dimensiuni care vor avea sau nu capătul 5' marcat. Prin îndepărtarea (la întâmplare) citozinei, guaninei, adeninei din probele 2, 3, 4 se obțin seturi de fragmente de dimensiuni diferite (mono, di, tri, tetra, ... nucleotide).
4. Se separă electroforetic fragmentele obținute în fiecare din cele 4 probe. Separarea se face funcție de numărul de nucleotide pe care îl conține fragmentul, indiferent de natura bazelor componente. Se identifică autoradiografic exclusiv fragmentele dinspre capătul 5' care a fost marcat și se indică numărul de nucleotide corespunzător fiecăruia prin comparare cu un etalon.

Admițind (figura V 10) că în proba 1, în care s-a excizat timina, s-au obținut di- și pentanucleotide marcate ( $G^*C$  și  $G^*CTCG$ ) este evident că timina reprezintă nucleotidul 3 respectiv 6 din oligonucleotidul analizat. Similar, dacă în proba 2 din care s-a exclus citozina se obțin mono, tri, hexanucleotide marcate ( $G^*$  — capătul 5',  $G^*CT$ ,  $G^*CTCGT$ ) rezultă că nucleotidele 2, 4 și 7 din oligonucleotidul de analizat sînt reprezentate de citozină. Raționînd identic pentru patternul obținut în cazul probelor 2 și 4 (fig. V.10) rezultă că oligonucleotidul analizat este nonanucleotidul  $GCTCGTCAA$ .

Se poate conchide că secvența nucleotidelor din orice ADN se poate stabili direct pe gel, citindu-l de jos în sus.



Oligonucleotid  
de analizat:

G\*CTCGTCAA

Bază excizată:

T

C

G

A

Fragmente radio-  
active rezultate:

G\*CTCG

GCT  
G\*CTCGT

G\*CTC

G\*CTCGTC  
G\*CTCGTCA

Start	Start	Start	Start	Start
				nonanucleotid
			G*CTCGTCA	octanucleotid
			G*CTCGTC	heptanucleotid
	G*CTCGT			hexanucleotid
G*CTCG				pentanucleotid
		G*CTC		tetranucleotid
	G*CT			trinucleotid
G*C				dinucleotid
	G*			mononucleotid
Proba 1	Proba 2	Proba 3	Proba 4	Proba de etalonare

Fig. V.10 — Determinarea secvenței nucleotidelor după tehnica Maxam și Gilbert.

Modalitatea alternativă de determinare a secvenței ADN clonat este metoda enzimatică elaborată de Sanger și colaboratori.

Prin tehnicile ADN recombinant, atât de greu abordabila moleculă de ADN poate fi analizată. Determinarea extrem de expeditivă a secvenței nucleotidelor a permis cunoașterea completă a secvenței a peste 100 de gene printre care cele codificând insulina, interferonii, citocromul c, hemoglobina. Mai mult, secvența aminoacizilor într-o proteină se stabilește acum, cel mai simplu, prin secvențializarea genei respective.

#### V.4.2. TRANSPOZIȚIA GENETICĂ

Unele gene sau seturi de gene, mai ales procariote, au abilitatea de a-și părăsi locusul original dintr-un cromozom migrând în alt locus (neomolog) pe același cromozom sau chiar în alt genom (neomolog). Astfel de elemente genetice mobile poartă numele de elemente transpozabile sau transpozoni.

Existența genelor mobile a fost semnalată de către Barbara Mc. Clintock în anii 1950. A fost necesară o lungă perioadă de timp pentru a se conchide că prezența în genom a genelor care „sar“ (jumping genes) este foarte răspândită, ea reprezentând o modalitate de modificare a genomului pe care a promovat-o selecția naturală. După 50 de ani de la descoperirea lor, Barbarei Mc Clintock i s-a conferit premiul Nobel pentru medicină.

Spre deosebire de recombinarea genetică, transpoziția elementelor mobile nu are la bază criteriul omologiei. Mai mult, transpoziția nu implică schimb de material genetic, ci adaos. La locul de origine a elementului genetic transpozabil se inseră o copie a acestuia, ceea ce are ca rezultat amplificarea genei în genom. Cu cât un transpozon va „călători“ mai mult, numărul de copii ale genei în genom va fi mai mare.

Integrarea genelor mobile în diferite locuri pe genom este mediată de așa-zisele secvențe de inserție; un transpozon rezultă numai în măsura în care o genă este delimitată, flancată de secvențe de inserție. Considerate drept cele mai mici elemente genetice mobile, secvențele de inserție cuprind 800—1 500 perechi de baze (corespunzând la dimensiunile a una-două gene), dar nu conțin, spre deosebire de transpozoni, gene cu expresie fenotipică. Aceste elemente pot însă modifica sensibil exprimarea genelor adiacente; pot bloca transcrierea acestora sau, dimpotrivă, o pot accelera (conțin semnale de start și oprire a transcrierii).

Este ușor de imaginat că abilitatea secvențelor de inserție de a migra, de a fi elemente transpozabile, poate transforma o genă oarecare într-un transpozon dacă hazardul sau un anumit semnal o aduc în situația de a fi flancată de secvențe de inserție.

Transpozonii pot fi inserați în diverse locuri din același sau alt cromozom, grație unui aparat enzimatic care recunoaște secvențele de inserție și permite fuzionarea fragmentelor neînrudite de ADN (fig. V.11) (recombinare neomoloagă). Transpozonii ar conține informația ereditară pentru

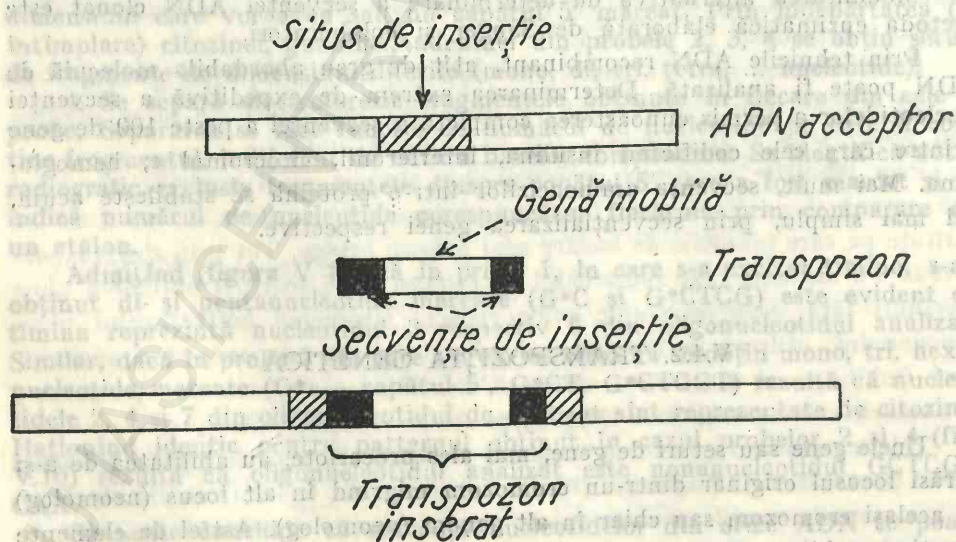


Fig. V.11 — Inserția unui transpozon într-un ADN acceptor.



sinteza de proteine implicate în propria lor transpoziție, fapt ce i-a făcut pe unii autori să-i desemneze ca pe „vehicule genetice autopropulsate”. Transpozonul bacterian  $Tn_3$ , unul dintre cei mai bine caracterizați, confirmă afirmația, el conținând gene ce decid sinteza a 3 proteine: lactamaza, răspunzătoare de rezistența la ampicilină și antibioticele înrudite, transpozaza, enzimă responsabilă de transpoziție, și o proteină represor, reglatoare a sintezei transpozazei.

Transpozonii conțin, așa cum s-a menționat, gene cu expresie fenotipică ce conferă receptorului calități noi, detectabile, printre care: rezistența la antibiotice, producerea de enterotoxine, rezistența la metale grele etc. Transferul genelor de rezistență la antibiotice de la un plasmid la altul (chiar în afara speciei) explică răspîndirea alarmantă a fenomenului de rezistență a microorganismelor. Ca transpoziția genelor determinante ale rezistenței să aibă loc, plasmidul trebuie să dispună de un factor de transfer al rezistenței — atribut al plasmidelor complexe. Cele mai multe plasmide conțin una, maximum două gene de rezistență la antibiotice, fără să conțină și factorul de transfer; acestea se integrează în plasmidele complexe rezultînd un plasmid infectant (cu capacitate de transfer), cu rezistență multiplă la antibiotice. Plasmidele și fagii pot să schimbe gene între ei și chiar cu cromozomul bacterian. Marea mobilitate a genelor procariote s-a evidențiat experimental prin urmărirea „itinerariilor” unei gene de rezistență la tetracilină, care „a plecat” dintr-o plasmidă în genomul fagului de la Salmonella, de aici în cromozomul Salmonellei, apoi în operonul *trp* din *E. coli* și înapoi în fag.

Fenomenul de transpoziție a genelor pledează pentru plasticitatea genomului procariot, pentru instabilitatea sa, în contrast cu imuabilitatea acreditată de concepțiile clasice. Mecanismele moleculare prin care se realizează transpoziția, sistemele enzimatice participante, condițiile structurale care determină transpoziția, semnalele care declanșează migrarea (este greu de admis că transpozonii „vagabondează” după bunul lor plac) sînt departe de a fi lămurite. Un lucru este cert și anume că, pe lângă mutații și recombinații genetice omologe, diversitatea fenotipică a microorganismelor este realizată și prin transpoziție. Ea poate să „reducă la tăcere” gena în care s-a inserat transpozonul (cel mai adesea reversibil), poate să creeze noi gene prin fuziunea genelor gazdă cu unii transpozoni, să modifice cantitativ exprimarea genelor. Elementele genetice transpozabile intervin nu numai în reorganizarea structurală a genomurilor bacteriene ci și în exprimarea informației conținute în genom. Selecția naturală a folosit transpoziția ca element de diversitate, probabil, în slujba adaptării și a evoluției. „Scenariul” ingineriei genetice care operează schimbul artificial de gene pare să fi fost înscris în mecanismele transpoziției genetice.

Elemente genetice transpozabile sînt prezente și în genomul eucariot. Prezența lor în imunocite este indubitabilă.

Multitudinea de anticorpi pe care trebuie să-i producă imunocitele în timpul diferențierii pentru a răspunde la numărul imens de antigene cu care organismul poate veni în contact se realizează esențial prin transpoziție.

Fiecare dintre milioanele de anticorpi produși leagă numai unul dintre milioanele de antigene posibile. Este greu de crezut că organismul are în patrimoniul său genetic cite o genă pentru fiecare anticorp pe care-l produce întrucît aceasta ar presupune o supradimensionare a genomului eucariot. Se știe că anticorpii sînt constituiți din două lanțuri polipeptidice grele,



identice, și două lanțuri ușoare, fiecare dintre ele conținând o porțiune constantă (C) și una variabilă (V). Secvența de aminoacizi în porțiunea variabilă este diferită pentru fiecare anticorp. Constatarea că genele ce corespund porțiunilor V și C ale unui anumit tip de lanț ușor sînt foarte apropiate în ADN al imunocitelor care produc acest tip de lanț ușor dar se găsesc departe una de alta în ADN al celulelor ce produc alte tipuri de anticorpi (conținând alte tipuri de lanțuri ușoare) a dus la concluzia că imunocitul selectează un anumit segment de ADN, codificînd porțiunea variabilă a unui anumit lanț ușor, și-l aduce prin transpoziție în proximitatea secvenței codificatoare a porțiunii constante a lanțului ușor. Gradul de diversificare în obținerea lanțurilor grele și ușoare este crescut prin aceea că o porțiune variabilă este în fapt rezultatul asamblării a trei regiuni:

- porțiunea variabilă, propriu-zisă (V) cuprinzînd aproximativ 400 de gene;

- porțiunea de diversitate, cuprinzînd aproximativ 12 gene;

- porțiunea de articulare (J) (joining), de legătură.

Transpoziția și asamblarea genelor corespunzătoare fragmentelor V, D, J, C în diferite aranjamente secvențiale asigură extrema varietate a anticorpilor.

### V.4.3. MUTAȚIILE

Schimbarea secvenței nucleotidelor într-o genă transmisă ereditar, poartă numele de mutație.

Mutațiile pot fi spontane sau induse de numeroși agenți mutageni fizici și chimici. Materialul genetic poate suferi modificări mai mult sau mai puțin severe constînd în:

- schimbarea stărilor, tautomere, cu posibilitatea împerecherii eronate a bazelor;

- depurinări; aproximativ 5 000 de baze purinice se pierd pe zi din cauza hidrolizei spontane a legăturii glicozidice;

- ruperea legăturilor fosfat diesterice dintr-o catenă;

- cross-linking al bazelor de pe catene opuse;

- dimerizarea timinei, cu formarea unor structuri ciclobutanice în cadrul aceleiași catene;

- dezaminări oxidative cu formarea unor compuși care fie nu se împerechează, fie sînt susceptibili la împerecheri eronate.

Modificările pot interesa o singură pereche de baze (mutații punctiforme) sau un grup de baze de pe una sau ambele catene ale unei molecule de ADN.

Schimbările mutagene punctiforme sînt rezultatul:

1. Substituției care poate decurge prin:

- a) tranziție — o pereche de baze este înlocuită cu alta, așa încît o bază purinică dintr-o catenă să fie înlocuită tot cu una purinică, sau o bază pirimidinică să fie înlocuită tot cu una pirimidinică.

Acidul azotos produce mutații prin tranziție dezaminînd adenina, a cărei pereche era timina, la hipoxantină, care se împerechează de preferință cu citozina.



b) transversie — o pereche de baze este înlocuită cu alta, așa încât o bază pirimidinică dintr-o catenă să fie înlocuită cu una purinică, iar cea purinică cu una pirimidinică. În fig. V.12 sînt reprezentate diferite mutații ce pot avea loc prin tranziție și transversie în gena structurală corespunzînd lanțului  $\beta$  al hemoglobinei, avînd ca rezultat substituirea aminoacidului valină din poziția 67 cu alți aminoacizi și deci apariția unor hemoglobine anormale.

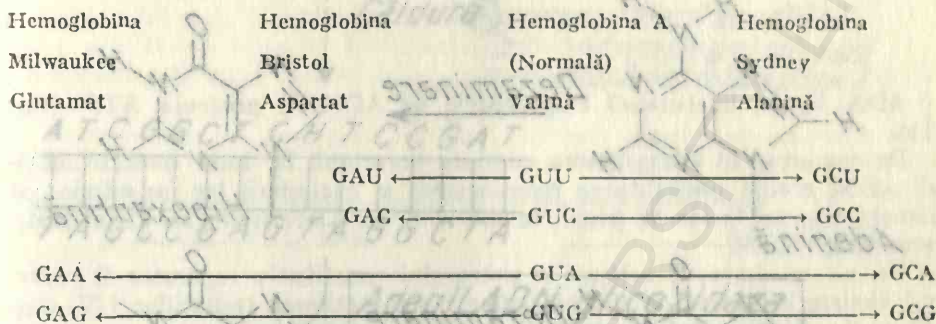


Fig. V.12 — Hemoglobinele anormale rezultate prin substituție în codonii care specifică valina din poziția 67 a lanțului.

## 2. Inserției — introducerii unei perechi de baze suplimentare.

Se produce inserții la tratarea unor culturi celulare cu acridină, moleculă plană care se poate intercala între două baze dintr-un lanț, fără să se lege covalent. În timpul replicării însă, pe catena complementară se înseriază corespunzător acridinei o bază suplimentară care se leagă covalent. La o replicare ulterioară va exista o pereche de baze suplimentară.

## 3. Deleției — excluderii unei perechi de baze.

Se produc deleții prin hidroliza unei baze din lanț, posibilă la variații de pH sau temperatură, ori prin acțiunea unor agenți care modifică o bază de așa natură încât aceasta nu mai este complementară cu nici o altă bază. Prin replicare, „golul“ apare pe ambele catene.

Necesitatea păstrării integrității informației genetice a organismelor impune eliminarea leziunilor și repararea moleculelor de ADN.

Structura dublu helicoidală a ADN permite ca, ori de câte ori o catenă este lezată, cealaltă să servească nu numai la păstrarea informației genetice dar și la repararea catenei lezate. Esențiale în procesul de reparare sînt detectarea leziunii și corectarea acesteia. Numeroase enzime (peste 50) conlucrează în aceste procese de recunoaștere specifică și reparare, „supraveghind“ continuu moleculele de ADN.

Acțiunea sistemului reparativ constitutiv presupune, în esență, următoarele etape:

- excizia secvenței alterate;
- sinteza unui fragment de ADN corespunzător porțiunii excizate;
- sudarea fragmentelor rezultate.

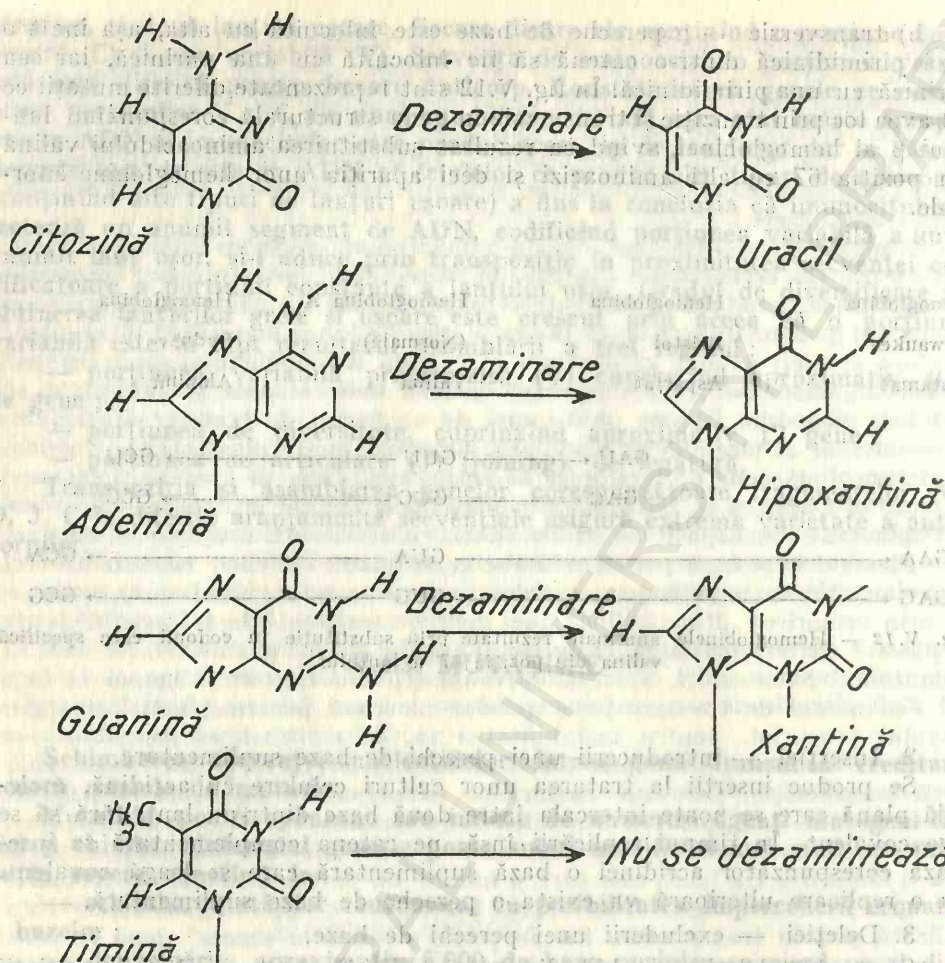


Fig. V.13 — Dezaminarea duce la baze azotate „străine” ADN.

Sistemul de excizie-refacere acționează atât în mutagenеза spontană, cât și în cea indusă de radiații sau de agenți chimici.

Vom ilustra acțiunea sistemului de reparare în situația dezaminării uneia dintre bazele azotate, care poate decurge spontan sau sub acțiunea acidului azotos. Prin dezaminare, citozina conduce la uracil, guanina la xantină, iar adenina la hipoxantină (fig. V.13).

Eliminarea bazelor rezultate se realizează sub acțiunea unor glicozidaze specifice, care recunosc legătura glicozidică purtătoare a unei baze alterate.

Endonucleaze specifice recunosc riboza neangajată în legătură glicozidică și clivează legăturile fosfat diesterice dintr-un fragment de ADN ce delimitează „golul” lăsat prin eliminarea bazei.

ADN polimeraza efectuează, folosind ca matriță catena de ADN „bună”, o copie a fragmentului de ADN excizat.



ATCGGCTCA TCCGAT  
TAGCCGAGTAGGCTA

Căldură

ATCGGCTCH TCCGAT  
TAGCCGAGTAGGCTA

Adenil ADN glicozidază

ATCGGCTC TCCGAT  
TAGCCGAGTAGGCTA

Nuclează

ATCGGCT CCGAT  
TAGCCGAGTAGGCTA

ADN polimerază + ADN ligază

ATCGGCTCATCCGAT  
TAGCCGAGTAGGCTA

Fig. V.14 — Repararea unei catene ADN în care a avut loc dezaminarea adeninei la hipoxantină.

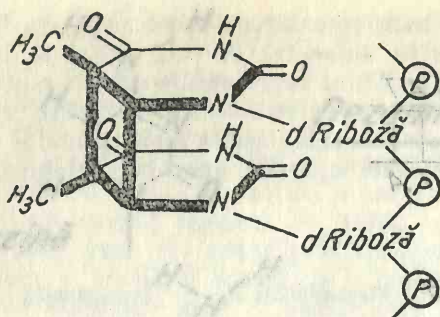


Fig. V.15 — Dimeri de timină.

ADN ligaza ligaturează fragmentele de ADN în prezența ATP (fig. V.14).

De remarcat că dezaminarea conduce invariabil la baze azotate străine ADN, creînd posibilitatea recunoașterii și excluderii lor (se admite că existența timinei în loc de uracil în molecula de ADN și-ar găsi astfel justificarea (fig. V.13).

Un alt exemplu de acțiune a sistemului constitutiv reparator îl reprezintă excizia dimerilor de timină formați prin acțiunea radiațiilor UV (fig. V.15 și fig. V.16). Defecte în activitatea enzimelor de reparare se traduc printr-o mare sensibilitate la acțiunea radiațiilor UV și o frecvență crescută a cancerelor de piele.

Repararea este realizată de sisteme enzimatice reparatorii care pot preceda procesul de replicare sau, dimpotrivă, acționează postreplicativ.

Enzimele reparatorii ce preced replicarea sînt în general enzime constitutive și pot fi surprinse de replicare în următoarele situații:

— leziunea este complet remediată și bifurcația de replicare trece normal;

— leziunea permite trecerea aparatului replicator dar catena în formare rămîne incompletă;

— leziunea nereparată încă nu permite desfășurarea replicării.

Pe lîngă sistemul constitutiv de reparare, organismele dispun de un sistem inductibil de reparare, reprezentat de o serie de factori de natură proteică, a căror fidelitate în replicare este numai aproximativă și care, din acest motiv, a fost denumit „sistemul reparator predispus la erori”. Cum el condiționează supraviețuirea, făcînd posibilă replicarea ADN, chiar dacă prin reparări oarecum aproximative, a fost denumit și sistem SOS.

De menționat că sistemul inductibil de reparare este tranzitoriu, încetîndu-și activitatea cînd acțiunea inductorilor săi a luat sfîrșit.

Leziunile care scapă sistemelor de reparare devin mutații.

### Exprimarea fenotipică a mutațiilor

Modificarea informației genetice din ADN prin mutație se exprimă datorită fluxului informațional ADN → ARN → proteină în însăși secvența aminoacizilor din proteine. Aceste proteine sînt proteine mutante. Mutațiile punctiforme care schimbă o singură bază dintr-un triplet prin transverție sau tranziție pot produce efecte diverse cînd se traduc în proteine.



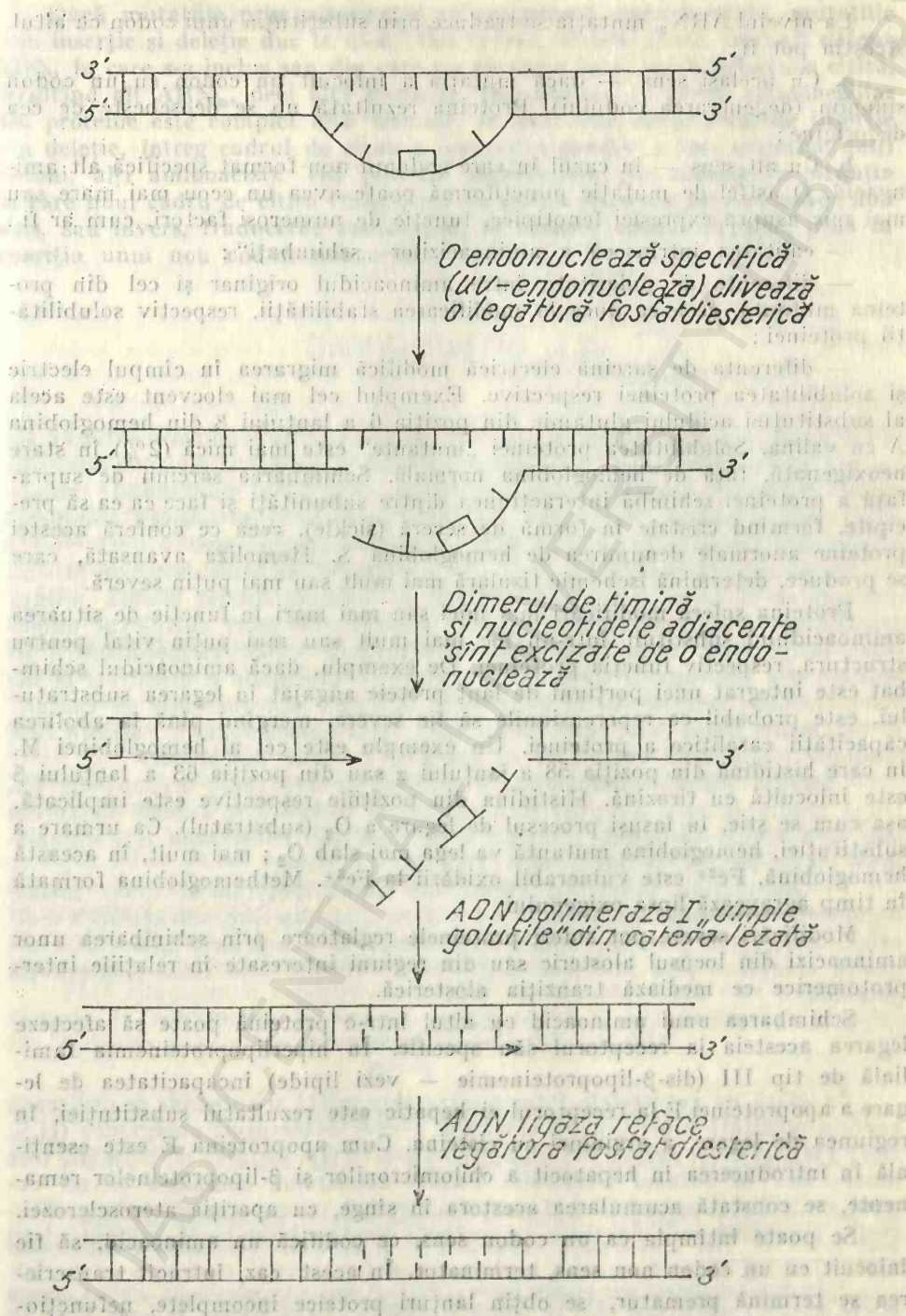


Fig. V.16 — Excizia dimerilor de timină (structuri, ciclobutanice).

La nivelul ARN<sub>m</sub>, mutația se traduce prin substituția unui codon cu altul. Aceștia pot fi:

a. Cu același sens — dacă mutația a înlocuit un codon cu un codon sinonim (degenerarea codului). Proteina rezultată nu se deosebește de cea de origine;

b. Cu alt sens — în cazul în care codonul nou-format specifică alt aminoacid. O astfel de mutație punctiformă poate avea un ecou mai mare sau mai mic asupra expresiei fenotipice, funcție de numeroși factori, cum ar fi:

— calitatea intrinsecă a aminoacizilor „schimbați”;

— diferența de polaritate între aminoacidul original și cel din proteina mutantă, ceea ce duce la modificarea stabilității, respectiv solubilității proteinei;

— diferența de sarcină electrică modifică migrarea în cimpul electric și solubilitatea proteinei respective. Exemplul cel mai elocvent este acela al substituției acidului glutamic din poziția 6 a lanțului  $\beta$  din hemoglobina A cu valina. Solubilitatea proteinei „mutante” este mai mică (2%) în stare neoxigenată, față de hemoglobina normală. Schimbarea sarcinii de suprafață a proteinei schimbă interacțiunea dintre subunități și face ca ea să precipite, formând cristale în formă de seceră (sickle), ceea ce conferă acestei proteine anormale denumirea de hemoglobină S. Hemoliza avansată, care se produce, determină ischemie tisulară mai mult sau mai puțin severă.

Proteina suferă modificări mai mici sau mai mari în funcție de situarea aminoacidului substituit într-un loc mai mult sau mai puțin vital pentru structură, respectiv funcția proteinei. De exemplu, dacă aminoacidul schimbat este integrat unei porțiuni de lanț proteic angajat în legarea substratului, este probabil ca repercusiunile să fie severe, mergând pînă la abolirea capacității catalitice a proteinei. Un exemplu este cel al hemoglobinei M, în care histidina din poziția 58 a lanțului  $\alpha$  sau din poziția 63 a lanțului  $\beta$  este înlocuită cu tirozină. Histidina din pozițiile respective este implicată, așa cum se știe, în însuși procesul de legare a  $O_2$  (substratul). Ca urmare a substituției, hemoglobina mutantă va lega mai slab  $O_2$ ; mai mult, în această hemoglobină,  $Fe^{2+}$  este vulnerabil oxidării la  $Fe^{3+}$ . Methemoglobina formată în timp agravează lipsa oxigenului.

Modificări severe pot suferi proteinele reglatoare prin schimbarea unor aminoacizi din locusul alosteric sau din regiuni interesate în relațiile interprotomerice ce mediază tranziția alosterică.

Schimbarea unui aminoacid cu altul într-o proteină poate să afecteze legarea acesteia la receptorul său specific. În hiperlipoproteinemia familială de tip III (dis- $\beta$ -lipoproteinemie — vezi lipide) incapacitatea de legare a apoproteinei E la receptorul ei hepatic este rezultatul substituției, în regiunea de legare, a argininei cu cisteina. Cum apoproteina E este esențială în introducerea în hepatocit a chilomicronilor și  $\beta$ -lipoproteinelor remanente, se constată acumularea acestora în sânge, cu apariția aterosclerozei.

Se poate întâmpla ca un codon sens, ce codifică un aminoacid, să fie înlocuit cu un codon non sens, terminator. În acest caz, întrucît transcrierea se termină prematur, se obțin lanțuri proteice incomplete, nefuncționale, care sînt degradate.



VI.1. INTRODUCERE

## Cap. VI. ENERGETICA BIOCHIMICĂ

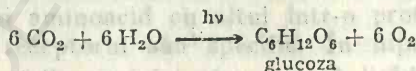
### VI.1. INTRODUCERE

Existența organismelor vii este condiționată de aportul continuu de energie din exterior. Celula, unitatea de bază a acestor organisme, este, din punct de vedere termodinamic, un sistem instabil și improbabil; numai un consum constant de energie îi permite să-și mențină ordinea complexă a structurii sale fragile de care depind funcțiile specializate.

Încercările de explicare a proceselor energetice din lumea vie prin prisma conceptelor și formalismului matematic al termodinamicii clasice, știința constituită în legătură cu funcționarea mașinilor termice, au relevat numeroase neajunsuri. Modul particular de acțiune a legilor termodinamicii în lumea vie a fost înțeles treptat, pe măsură ce biochimia a descifrat, la nivel molecular, transformările însoțite de eliberare sau absorbție de energie. A luat astfel ființă „energetica biochimică” sau „bioenergetica”, știința care studiază schimbările energetice ce însoțesc reacțiile biochimice.

Radiația solară constituie sursa primară pentru toate organismele vii. După modul în care recepționează energia și totodată în funcție de forma sub care preiau carbonul, principalul element din constituția lor, organismele vii se împart în două mari categorii:

— Organismele autotrofe, cuprinzând lumea vegetală și unele microorganisme, utilizează drept sursă de carbon  $\text{CO}_2$ , din care, sub acțiunea radiației solare, prin procesul numit fotosinteză, își construiesc moleculele organice complexe prin intermediul glucozei. Procesul este redat prin ecuația generală\*:

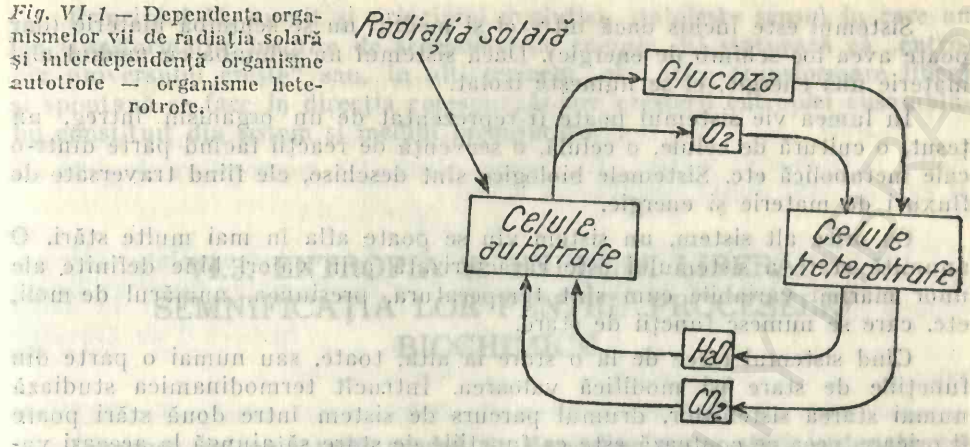


În afară de autotrofele fotosintetizatoare există și autotrofe ce utilizează energia rezultată din oxidarea anaerobă a unor substraturi anorganice ( $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{NH}_3$  etc.) pentru sinteza de compuși organici. În ultimul deceniu au fost descoperite în adâncul Oceanului Pacific ecosisteme complexe ce nu depind de radiația solară, avînd ca primă verigă microorganisme chemo-litotrofe. Problema este de mare importanță pentru înțelegerea originii vieții

\* Întrucît fotosinteza este proprie lumii vegetale și unor microorganisme, studiul acestui proces depășește cadrul unei cărți de biochimie medicală. Ea e tratată în orice carte de biochimie generală.



Fig. VI.1 — Dependența organismelor vii de radiația solară și interdependență organisme autotrofe — organisme heterotrofe.



pe pământ, dar din punct de vedere practic, ponderea autotrofelor chemo-sintetizatoare în ansamblul biosferei actuale este absolut neglijabilă.

— Organismele heterotrofe, cuprinzând lumea animală, își procură energia și în același timp carbonul sub formă de compuși organici compleși, în primul rând glucidele, lipidele și proteinele sintetizate de autotrofe sau de alte heterotrofe. Degradarea acestor compuși preluați din exterior, dar și a celor proprii constituiți ca rezerve, la compuși simpli, însoțită de eliberarea de energie, constituie catabolismul. Reacțiile chimice care alcătuiesc căile catabolice se realizează, în marea lor majoritate, cu participarea oxigenului molecular, deci în condiții aerobe; principalii produși de catabolizare sînt în acest caz  $\text{CO}_2$  și  $\text{H}_2\text{O}$ . Energia eliberată în procesele catabolice este utilizată în vederea sintezelor de compuși organici diverși ceea ce reprezintă anabolismul dar și pentru susținerea a numeroase alte procese consumatoare de energie cum sînt cele mecanice (contractia musculară), electrice (potențiale membranare) și altele.

Întrucît organismele autotrofe utilizează în procesul de fotosinteză  $\text{CO}_2$  și  $\text{H}_2\text{O}$ , adică exact compușii pe care heterotrofele îi eliberează în cursul degradărilor aerobe (oxigenul necesar acestor degradări fiind obținut tot în procesul fotosintezei), cele două tipuri de organisme se intercondiționează (sintrofia). Figura VI.1 redă schematicizat acest aspect ca și dependența tuturor organismelor vii de radiația solară.

Fără cunoașterea aspectelor esențiale ale bioenergeticii, care vor fi prezentate în continuare, înțelegerea aprofundată a metabolismului glucidelor, lipidelor și proteinelor nu este posibilă.

## VI.2. SISTEME TERMODINAMICE.

### FUNCȚII DE STARE. PRINCIPIILE TERMODINAMICII

Termodinamica, în orice domeniu se aplică, studiază comportarea de ansamblu a sistemelor fără să ia în considerare structura lor. Sistemul este definit ca o parte a universului, separată real sau imaginar de mediul înconjurător, în care se desfășoară un proces. Mediul înconjurător este reprezentat de restul universului.

Sistemul este închis dacă între el și mediu nu se schimbă materie (dar poate avea loc schimb de energie). Dacă sistemul nu schimbă cu mediul nici materie nici energie, el se numește izolat.

În lumea vie sistemul poate fi reprezentat de un organism întreg, un țesut, o cultură de celule, o celulă, o secvență de reacții făcând parte dintr-o cale metabolică etc. Sistemele biologice sînt deschise, ele fiind traversate de fluxuri de materie și energie.

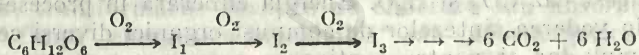
Ca orice alt sistem, un sistem viu se poate afla în mai multe stări. O anumită stare a sistemului este caracterizată prin valori bine definite ale unor mărimi variabile cum sînt temperatura, presiunea, numărul de moli, etc. care se numesc funcții de stare.

Cînd sistemul trece de la o stare la alta, toate, sau numai o parte din funcțiile de stare își modifică valoarea. Întrucît termodinamica studiază numai starea sistemelor, drumul parcurs de sistem între două stări poate fi oricare, ceea ce contează este ca funcțiile de stare să ajungă la aceeași valoare.

Dată fiind importanța pentru biochimie a acestui ultim aspect se dă în continuare un exemplu. Se consideră transformarea prin oxidare a glucozei (starea inițială) în  $\text{CO}_2$  și  $\text{H}_2\text{O}$  (starea finală). Această transformare se poate face printr-o oxidare energetică (în bomba calorimetrică) conform reacției :



sau prin intermediul unei succesiuni de reacții de oxidare mai puțin energetice :



unde  $\text{I}_1$ ,  $\text{I}_2$ ,  $\text{I}_3$  sînt intermediari în procesul de oxidare.

Starea finală a sistemului format din  $\text{CO}_2$  și  $\text{H}_2\text{O}$  este aceeași indiferent că el s-a obținut prin prima sau cea de-a doua transformare (dacă condițiile în care se află  $\text{CO}_2$  și  $\text{H}_2\text{O}$  la sfîrșit sînt identice).

Se menționează aici și se va vedea pe larg în capitolele ce urmează că sistemelor vii le sînt proprii căile oxidative (catabolice, degradative), prin reacții consecutive, eliberarea energiei făcîndu-se în trepte, după necesități. Oxidarea „dintr-o dată“ a glucozei, a acizilor grași sau a aminoacizilor ar presupune, dacă ne referim numai la aspectul energetic, existența unor „rezervoare“ în care energia să fie stocată pentru a putea fi apoi utilizată în mod treptat.

Legile termodinamicii sînt tocmai relațiile, formulate adesea matematic, între funcțiile de stare. La baza tuturor legilor stau două principii, adevăruri incontestabile reieșite din nenumărate observații ale fenomenelor naturale precum și din experiențe.

Principiul I este principiul conservării energiei : „În orice proces energia totală a universului se conservă“. El prevede posibilitatea transformării unei forme de energie în altele, fiind adeseori formulat și astfel : „Energia nu poate fi nici creată nici distrusă ; ea poate suferi doar transformări dintr-o formă în alta sau poate trece de la un sistem la altul“.



Principiul II, numit și principiul evoluției, stabilește sensul în care au loc transformările însoțite de schimburi de energie. El statuează că „entropia universului crește” sau, în alți termeni, că „orice transformare liberă și spontană se face în direcția corespunzătoare creșterii entropiei ansamblului constituit din sistem și mediul înconjurător”.

### VI.3. ENTROPIA ȘI ENERGIA LIBERĂ. SEMNIFICAȚIA LOR PENTRU PROCESELE BIOCHIMICE

Deoarece entropia redă gradul de dezordine (unei stări ordonate corespunzându-i o entropie mică, unei stări dezordonate o entropie mare) înșamnă că transformările spontane decurg în sensul creșterii dezordinii. Starea corespunzătoare valorii maxime a entropiei este starea de echilibru. Odată atinsă starea de echilibru transformarea încetează.

Dacă tendința spontană de evoluție a sistemelor este înspre creșterea entropiei, cum este posibilă existența organismelor vii, sisteme caracterizate printr-un înalt grad de organizare?

Principiul II oferă posibilitatea unui răspuns la această întrebare. Din formularea matematică a acestuia:

$$\Delta S_{\text{univers}} = \Delta S_{\text{sistem}} + \Delta S_{\text{mediu}} > 0 \quad (1)$$

rezultă că  $\Delta S_{\text{univers}} > 0$  nu numai cînd  $\Delta S_{\text{sistem}} > 0$  și  $\Delta S_{\text{mediu}} > 0$  ci și cînd  $\Delta S_{\text{sistem}} < 0$  și  $\Delta S_{\text{mediu}} > 0$  cu condiția ca în valoare absolută  $\Delta S_{\text{mediu}}$  să fie mai mare decît  $\Delta S_{\text{sistem}}$ :

$$|\Delta S_{\text{mediu}}| > |\Delta S_{\text{sistem}}|$$

Cum orice sistem viu este foarte restrîns în raport cu mediul, condiția este realizabilă: sistemul viu se poate organiza pe seama dezorganizării mediului.

Această interpretare este strict teoretică întrucît nu este posibilă determinarea variației de entropie a unui sistem viu oricît de simplu ar fi el\* și nici a mediului reprezentat de restul universului. Pe de altă parte, ea este și extrem de simplistă, întrucît, printre altele, nu ia în considerație faptul că sistemele vii sînt, după cum s-a mai menționat, sisteme deschise.

Ținînd seama de acest ultim aspect, că și de altele care vor reieși în continuare, parametrul termodinamic mult mai potrivit pentru evoluția din punct de vedere energetic a sistemelor vii îl reprezintă „energia liberă”.

Energia liberă reprezintă acea parte din energia internă (totală) a sistemului care este capabilă să efectueze un travaliu asupra mediului, în condiții constante de temperatură și presiune.

\* Variația de entropie se măsoară cu suficientă precizie doar în cazul sistemelor reprezentate de elemente chimice și molecule mici.

Avantajul utilizării energiei libere rezultă din faptul că temperatura și presiunea constantă reprezintă chiar parametri caracteristici sistemelor vii; la acesta se adaugă și posibilitatea determinării pe căi indirecte a variației energiei libere în reacțiile care au loc în lumea vie.

Energia liberă este corelată cu alte funcții termodinamice de stare. Astfel între energia internă (E), energia liberă (G), temperatura absolută (T) și entropia (S) există următoarea relație:

$$E = G + T \cdot S \quad (2)$$

Cum însă în termodinamică nu se operează cu valori absolute ale energiilor\* ci cu variațiile lor între două stări, în locul ecuației (2) se utilizează ecuația (3)\*\*:

$$\Delta E = \Delta G + T \cdot \Delta S \quad (3)$$

sau:

$$\Delta G = \Delta E - T \cdot \Delta S \quad (4)$$

Semnificațiile lui  $\Delta G$  și  $\Delta S$  fiind precizate se menționează că T reprezintă temperatura absolută la care are loc transformarea iar  $\Delta E$  variația energiei totale a sistemului (la a cărei valoare contribuie numeroși factori ca, de exemplu, energiile nucleelor, ale electronilor, a mișcărilor de translație, rotație și vibrație etc.).

Din ecuațiile (3) și (4) rezultă că în cursul unei transformări care are loc la temperatură și presiune constantă, pe lângă componenta capabilă să efectueze lucru (deci o mișcare ordonată), există obligatoriu și o componentă  $T \cdot \Delta S$  care reprezintă o formă de energie degradată, de calitate inferioară. În opoziție cu energia liberă acestei părți din energia totală i se spune „energie legată“.

## VI.4. VARIAȚIA ENERGIEI LIBERE ÎN REACȚIILE CHIMICE ȘI BIOCHIMICE

În sistemele vii, transformările se produc în esență prin reacții chimice: de aceea în bioenergetică interesează  $\Delta G$  a acestor reacții.

Respectind convenția de semne din termodinamică, după valoarea lui  $\Delta G$ , reacțiile chimice pot fi împărțite în:

- $\Delta G < 0$ ; reacție „exergonică“; ea evoluează spontan în sensul de la stînga la dreapta și poate efectua lucru;
- $\Delta G > 0$ ; „endergonică“; ea nu poate efectua lucru și necesită, pentru desfășurarea în sensul de la stînga la dreapta, energie din exterior\*\*\*;
- $\Delta G = 0$ ; reacția este la echilibru; ea nu poate evolua spontan în nici un sens.

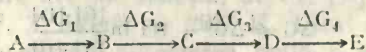
\* Valorile absolute sînt de altfel imposibil de calculat sau măsurat la sisteme complexe.

\*\* Ecuația generală în termodinamică este  $\Delta H = \Delta G + T \Delta S$ , unde  $\Delta H$  reprezintă variația de entalpie. Din motive care vor reieși mai departe, în transformările din organismele vii,  $\Delta H \approx \Delta E$ .

\*\*\* A se face distincția între reacții „exergonice — endergonice“ și reacții „exoterme-endermice“. Reacțiile sînt exergonice sau endergonice după valoarea lui  $\Delta G$  și exoterme sau endoterme după valoarea lui  $\Delta H$  (entalpie, variația căldurii).



Aşa cum s-a mai arătat, în organisme vii majoritatea reacţiilor chimice fac parte din „căi metabolice” care constau din secvenţe de reacţii, fiecărei reacţii corespunzându-i o variaţie de energie :



Energia liberă fiind o mărime aditivă  $\Delta G_{\text{total}}$  este :

$$\Delta G_{\text{total}} = \Delta G_1 + \Delta G_2 + \Delta G_3 + \Delta G_4 \quad (5)$$

Dacă  $\Delta G_{\text{total}} < 0$  calea metabolică este, în ansamblul ei, exergonică; într-o astfel de cale nu este obligatoriu ca  $\Delta G$  pentru fiecare reacţie în parte să fie negativă, pentru unele reacţii putând fi pozitivă. Energia eliberată va fi evident :

$$\Delta G_{\text{total}} = |\Sigma \Delta G_{\text{negative}}| - |\Sigma \Delta G_{\text{pozitive}}|$$

Căile exergonice sînt căile degradative (catabolice). În căile endergonice (de biosinteză, anabolice) situaţia este inversă.

Înainte de a intra în detaliile mecanismelor energetice ale sistemelor vii, se revine asupra problemei fundamentale reprezentată de modul cum acestea îşi asigură existenţa în raport permanent cu mediul. Referinţele se fac la organisme heterotrofe: moleculele complexe (glucide, lipide, proteine) preluate de aceste organisme prin hrană sînt degradate prin căi catabolice pe parcursul cărora există un număr mare reacţii cu  $\Delta G < 0$ ; această energie va susţine reacţiile cu  $\Delta G > 0$  din căile anabolice (sinteze de compuşi specifici, pe plan mai general, organizare) şi alte procese „ordonate” (mecanice, gradienti, potenţiale etc.). Energia neutilizabilă din energia totală ( $T \cdot \Delta S$ ) este returnată mediului, contribuind la dezorganizarea acestuia. Prin intermediul moleculelor complexe din hrană (dar şi a unor molecule simple) organisme heterotrofe îşi asigură totodată elementele şi compuşi chimici pe care le vor utiliza ca atare sau vor servi la sinteza de compuşi specifici. În acelaşi timp produşii de degradare sînt în parte expediaţi în mediu. Organismele vii heterotrofe (pe plan mai general toate organisme vii) îşi datorează deci existenţa faptului că sînt sisteme deschise, traversate de fluxuri de materie şi energie.

Transferul energiei libere între reacţiile cu  $\Delta G < 0$  şi cele cu  $\Delta G > 0$  se face însă în organisme vii într-un mod cu totul particular, neîntilnit la alte sisteme.

#### VI.4.1. VARIAȚIA ENERGIEI LIBERE ȘI CONSTANTA DE ECHILIBRU. ENERGIA LIBERĂ DE REACȚIE STANDARD

Metodele pentru determinarea lui  $\Delta G$  în reacţiile chimice sînt indirecte. Ele se bazează pe relaţiile care leagă  $\Delta G$  de alte mărimi specifice proceselor chimice şi care se măsoară direct: constanta de echilibru şi, în cazul reacţiilor de oxidoreducere, potenţialul de oxidoreducere.

Dacă energia liberă exprimă tendinţa reacţiei de a atinge echilibrul, ( $\Delta G = 0$ ), se înţelege că  $\Delta G$  va fi cu atît mai mare cu cit, în starea iniţială,

reacția este mai departe de echilibrul ei; deci trebuie să existe o relație a lui  $\Delta G$  cu concentrația reactanților și produșilor de reacție. Pentru reacția generală:  $A + B \rightleftharpoons C + D$  această relație este:

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[C] \cdot [D]}{[A] \cdot [B]} \quad (6)$$

unde  $R$  este constanta generală a gazelor ( $1,98 \text{ cal mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ),  $T$  = temperatura absolută la care se desfășoară reacția  $[A]$ ,  $[B]$ ,  $[C]$ ,  $[D]$  concentrațiile reactanților și produșilor iar  $\Delta G^\circ$  o constantă numită „energie liberă de reacție standard“.

Pentru a defini pe  $\Delta G^\circ$  se consideră  $[A] = [B] = [C] = [D] = 1 \text{ M}$ ; atunci  $\ln [C] \cdot [D] / [A] \cdot [B] = 0$  și  $\Delta G = \Delta G^\circ$ . Deci „ $\Delta G^\circ$  este variația energiei libere în reacție atunci când concentrația inițială a tuturor componentelor este 1 M ( $T = 298^\circ \text{ K}$ )“.

Ținând seama că la echilibru  $\Delta G = 0$  și înlocuind pe  $[C] \cdot [D] / [A] \cdot [B] = K_{\text{ech}}$ ; se obține:

$$\begin{aligned} 0 &= \Delta G^\circ + RT \ln K_{\text{ech}} \\ \Delta G^\circ &= -RT \ln K_{\text{ech}} \end{aligned} \quad (7)$$

Ecuatia (7) permite obținerea valorilor lui  $\Delta G^\circ$ ; pentru aceasta, reacția efectuată în condițiile standard menționate este urmărită pînă la atingerea echilibrului cînd se determină noile concentrații  $[A]$ ,  $[B]$ ,  $[C]$  și  $[D]$ .

Valorile lui  $\Delta G^\circ$  sînt:

- negativă,  $K_{\text{ech}} > 0$ ;
- pozitivă, pentru  $K_{\text{ech}} < 0$ ;
- zero, pentru  $K_{\text{ech}} = 0$ .

Pentru a respecta în întregime condițiile în care se desfășoară reacțiile chimice în organismele vii, în locul valorii  $\Delta G^\circ$  care corespunde pentru  $\text{pH} = 0^*$  se utilizează valoarea corectată notată  $\Delta G'^\circ$  care corespunde pentru  $\text{pH} = 7^{**}$ . Deci  $\Delta G'^\circ$  reprezintă variația energiei libere standard în reacțiile chimice care se desfășoară la  $\text{pH} = 7$ .

Valoarea lui  $\Delta G'^\circ$  s-a măsurat pentru un număr foarte mare de reacții care au loc în organismele vii (tabelul VI.1).

Tabelul VI.1

Valorile  $\Delta G'^\circ$  pentru cîteva reacții care au loc în organismele vii

Tipul reacției	Reacția	$\Delta G'^\circ$ kcal/mol
Oxidare	Acid palmitic + $23 \text{ O}_2 \rightarrow 16 \text{ CO}_2 + 16 \text{ H}_2\text{O}$	-2 338,0
Oxidare	Glucoză + $6 \text{ O}_2 \rightarrow 6 \text{ CO}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O}$	-686,0
Hidroliză	Zaharoză + $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Glucoză} + \text{Fructoză}$	-5,5
Hidroliză	$\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i$	-7,3
Hidroliză	$\text{Glucozo-6-P} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Glucoză} + \text{P}_i$	-3,3
Izomerizare	$\text{Glucozo-1-P} \rightarrow \text{Glucoză-6-P}$	-1,7
Eliminare	Acid malic $\rightarrow$ Acid fumaric + $\text{H}_2\text{O}$	+0,88
Condensare	Acid glutamic + $\text{NH}_3 \rightarrow \text{Glutamină} + \text{H}_2\text{O}$	+3,4
Condensare	Glicină + Glicină $\rightarrow$ Glicilglicină + $\text{H}_2\text{O}$	+2,2

\* Pentru a înțelege acest lucru considerăm că unul din compușii A, B, C, D este un acid tare; identificînd concentrația acidului cu a ionilor  $\text{H}^+$ , pentru condițiile standard de determinare a lui  $\Delta G^\circ$ ; rezultă că  $\text{pH} = 0$ .

\*\* Cu unele excepții,  $\text{pH}$ -ul în țesuturi, precum și al uniorilor din organism, este în jur de 7.



Se impune înțelegerea corectă a semnificațiilor lui  $\Delta G''$  și  $\Delta G$ ;  $\Delta G''$  indică sensul de desfășurare a reacției în condiții standard (cele menționate anterior) și este o constantă în timp, ce  $\Delta G$  este variația energiei libere în condițiile specifice în care are loc reacția, de ex. [A], [B], [C] și [D] diferite de 1 M, pH diferit de 7, T diferit de 298° K. Ideal ar fi să se poată obține valoarea lui  $\Delta G$ , ea permițând aprecierea reală a stării energetice într-un compartiment sau altul al organismului viu. Dacă în celule acest lucru este practic imposibil se pot însă obține valori ale lui  $\Delta G$  pentru unele reacții care au loc în sistemele așa-numite „acelulare“ descrise anterior.

Analizând ecuația (6) se poate ușor observa că  $\Delta G$  poate fi negativă chiar dacă  $\Delta G''$  pentru reacția dată este pozitivă (dar mică în valoare absolută) cu condiția ca termenul al doilea al ecuației să aibă valoare negativă mare. Astfel de situații se întâlnesc desigur în mod curent în celule. Oricum  $\Delta G''$  este de mare valoare în energetica biochimică, așa cum se va vedea în continuare în acest capitol.

#### VI.4.2. VARIATIA ENERGIEI LIBERE ÎN REACȚIILE DE OXIDO-REDUCERE. POTENȚIALUL REDOX ȘI LEGĂTURA LUI CU ENERGIA LIBERĂ

Analiza datelor din tabelul VI.1 evidențiază că în reacțiile de oxidare la  $\text{CO}_2$  și  $\text{H}_2\text{O}$  ale glucozei și acizilor grași  $\Delta G''$  are valori negative foarte mari. Aceste valori s-au obținut oxidind compușii cu exces de  $\text{O}_2$  în bomba calorimetrică. În organisme vii aerobe atât glucoza cit și acizii grași, care provin din alimente sau din rezerve, sint degradate oxidativ tot la  $\text{CO}_2$  și  $\text{H}_2\text{O}$ . Diferența constă doar în faptul că în organismele vii degradările oxidative se fac treptat, prin intermediul unui număr foarte mare de reacții. Dar  $\Delta G''_{\text{total}}$  al degradării în trepte a unui mol de glucoză este tot -686 kcal iar a unui mol de acid palmitic de -2338 kcal. Valorile ridicate ale  $\Delta G''$  explică de ce glucidele și lipidele sint principalii compuși furnizori de energie în organismele vii heterotrofe.

În cazul reacțiilor de oxido-reducere  $\Delta G''$  se poate calcula din relația care leagă această mărime cu potențialul redox standard corectat pentru  $\text{pH} = 7$ , notat  $E'_0$ :

$$\Delta G'' = -n \cdot F \cdot \Delta E'_0 \quad (8)$$

unde  $n$  este numărul de electroni acceptați sau cedați de partenerii la reacția de oxido-reducere, iar  $F$  echivalentul caloric al unui Faraday (23,062 kcal).

Valoarea lui  $E'_0$  se obține măsurind pe  $E_0$  (fig. VI.2) care este potențialul redox standard al sistemului de oxido-reducere la  $\text{pH} = 0$  și adăugînd -0,421 V cit reprezintă potențialul redox al unui electrod de hidrogen în care  $[\text{H}^+] = 10^{-7}$  ioni/litru față de electrodul normal de hidrogen. Valorile  $E'_0$  pentru o serie de reacții redox importante în biochimie se dau în tabelul VI.2.

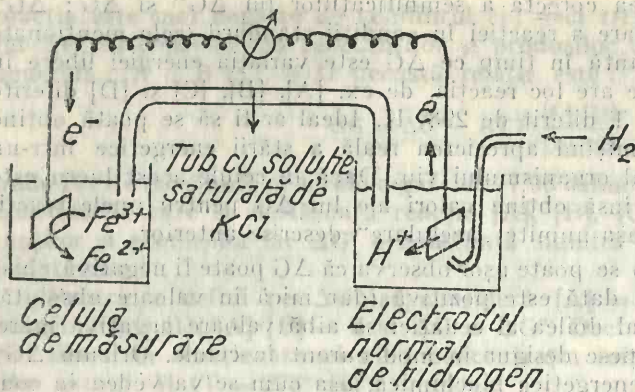


Fig. VI.2 — Determinarea potențialului redox standard ( $E_0$ ) al unui sistem de oxido-reducere. Electrocul normal de hidrogen constă dintr-o placă de platină cufundată într-o soluție de acid tare de concentrație 1M în care se suflă un curent de  $H_2$  la presiune de 1 atm. Reacția de oxidoreducere care are loc este  $H_2 \rightleftharpoons 2 H^+ + 2 e^-$ . Potențialul redox al acestui electrod este, prin convenție, zero. În celula de măsurare concentrațiile formei oxidate și a celei reduse sînt de 1 M.

În afara posibilității ce o oferă pentru calculul lui  $\Delta G^\circ$ , valorile potențialelor redox standard sînt utile și în stabilirea sensului de curgere a electro-nilor în sisteme conținînd mai multe cupluri de oxido-reducere (vezi „lanțul

Tabelul VI.2

Valorile  $E'_0$  ale unor sisteme redox (determinate la temperatură între 25—30°C)

Reacția de electrod	$E'_0$ volți
$2 H^+ + 2 e^- \rightleftharpoons H_2$	—0,421
$\alpha$ -cetoglutarat + $CO_2 + 2 H^+ + 2 e^- \rightleftharpoons 2$ Izocitrat	—0,380
$NAD^+ + 2 H^+ + 2 e^- \rightleftharpoons NADH + H^+$	—0,320
$NADP^+ + 2 H^+ + 2 e^- \rightleftharpoons NADPH + H^+$	—0,324
Piruvat + $2 H^+ + 2 e^- \rightleftharpoons$ Lactat	—0,185
Oxaloacetat + $2 H^+ + 2 e^- \rightleftharpoons$ malat	—0,166
Fumarat + $2 H^+ + 2 e^- \rightleftharpoons$ succinat	+0,031
2 cit. c (ox) + $2 e^- \rightleftharpoons 2$ cit. c (red)	+0,254
2 cit. a <sub>2</sub> (ox) + $2 e^- \rightleftharpoons 2$ cit. a <sub>2</sub> (red)	+0,385
$1/2 O_2 + 2 H^+ + 2 e^- \rightleftharpoons H_2O$	+0,816

respirator"); ca și în cazul lui  $\Delta G^\circ$ , valoarea informațională a lui  $E'_0$  este limitată la condițiile standard. Potențialul redox al unui sistem care nu se află în condiții standard se calculează cu relația:

$$E = E'_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[Ox]}{[Red]} \quad (9)$$

unde R, T, n, F sînt constantele menționate anterior, [Ox] și [Red] fiind coccntrațiile formei oxidate, respectiv reduse.



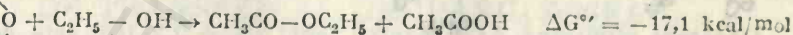
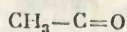
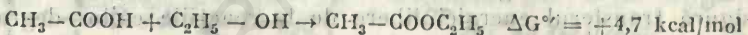
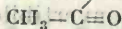
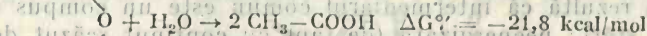
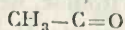
## VI.5. CUPLAREA REACȚIILOR ENDERAGONICE CU CELE EXERAGONICE. INTERMEDIARUL ENERGETIC COMUN

Organismele vii utilizează în permanență mari cantități de energie atât pentru sinteza compușilor cu structuri complexe (proteine, acizi nucleici, lipide, polizaharide, etc.), cât și pentru susținerea unor procese cum sint contracția musculară, excitația nervoasă, transportul activ și altele. De aceea transferul energiei libere rezultată din reacțiile exergonice ale căilor degradative către aceste procese, toate avînd o bază moleculară, trebuie să se realizeze cu mare eficiență.

Constanța temperaturii face ca transferul energiei în sistemele biologice să fie posibil numai prin reacții „cuplate”: două reacții sint cuplate dacă energia liberă a uneia, care este exergonică, determină desfășurarea celeilalte, care este endergonică.

O reacție endergonică dată nu poate fi cuplată cu o anumită reacție exergonică decît în una din următoarele situații:

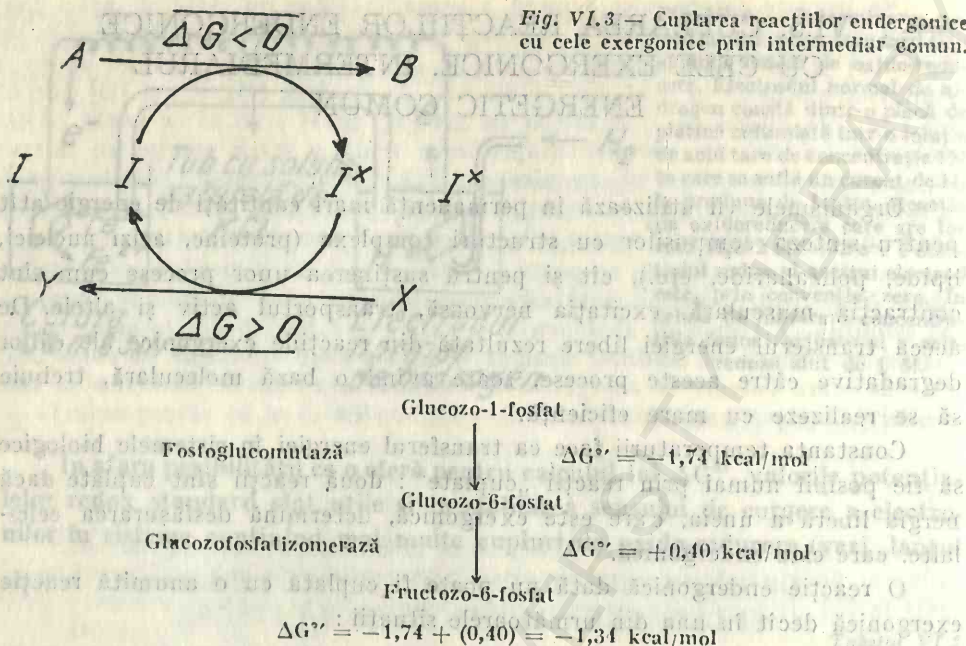
a) Cînd unul din produșii de reacție ai reacției exergonice este reagent în reacția endergonică. De exemplu cuplarea reacției de hidroliză a anhidridei acetice cu sinteza acetatului de etil din acid acetic și alcool etilic:



În acest cuplaj schimbul de energie liberă se realizează prin intermediul acidului acetic a cărui formare, într-o reacție puternic exergonică, asigură desfășurarea celei de a doua, endergonică.

În organismele vii operează numeroase reacții cuplate în acest mod. Ele sint de regulă reacții succesive în cadrul aceleiași căi metabolice. Se exemplifică în continuare prin două reacții succesive care fac parte din calea de degradare a glicogenului în mușchi: glucozo-1-fosfat  $\rightarrow$  glucozo-6-fosfat și glucozo-6-fosfat  $\rightarrow$  fructozo-6-fosfat.

Fig. VI.3. — Cuplarea reacțiilor endergonice cu cele exergonice prin intermediar comun.



Existența acestor cuplaje constituie una din explicațiile desfășurării cu mare ușurință în organismele vii a unor reacții (izomerizarea glucoso-6-fosfat  $\rightleftharpoons$  fructozo-6-fosfat) a căror randamente în alte condiții sînt minime.

b) Cuplarea reacției endergonice la reacția exergonică prin „intermediar energetic comun“ (fig. VI.3).

Din figură rezultă că intermediarul comun este un compus capabil să existe în două stări: neenergizată (de fapt cu conținut scăzut de energie), notată I, și energizată,  $I^*$ . Cele două forme sînt interconvertibile prin absorbție  $\rightleftharpoons$  cedare de energie liberă. Mecanismul acestui sistem de cuplaj, care asigură transferul energiei libere de la reacțiile căilor degradative ale glucidelor, lipidelor și proteinelor către cele mai diverse reacții consumatoare de energie, este prezentat în contextul mai larg al următorului paragraf.

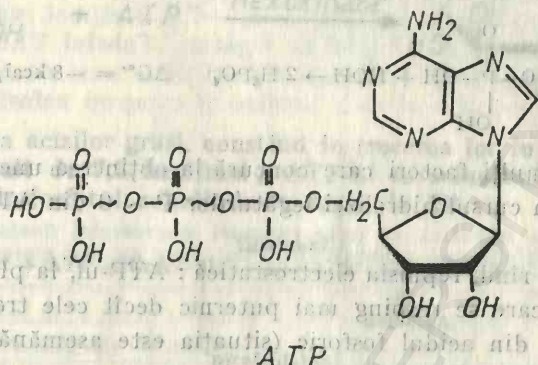
## VI.6. LEGĂTURI MACROERGICE. SISTEMUL ATP/ADP+P<sub>i</sub>, PRINCIPALUL INTERMEDIAR ENERGETIC COMUN (COMPUS MACROERGIC)

Stările  $I^*$  și I ale intermediarului energetic comun nu au nici o legătură cu stările excitate — neexcitate ale atomilor și moleculelor, stări convertibile prin absorbție-emisie de cuante de energie.  $I^*$  reprezintă un compus care are „legături macroergice“ în timp ce I constă de fapt din două substanțe care se obțin din  $I^*$  în urma ruperii acestor legături.

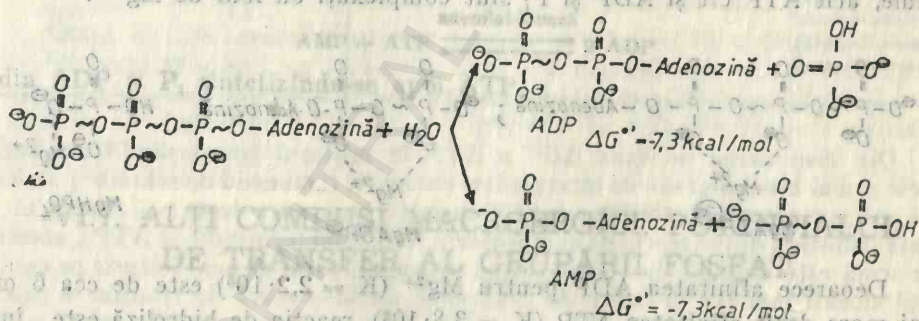


Deoarece sistemul format din ATP (acidul adenozintrifosforic, corespunzând lui I<sup>3</sup>) și ADP + H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (corespunzând lui I) constituie intermediarul energetic comun în majoritatea reacțiilor cuplate, discuția se focalizează asupra acestuia. ATP-ul ca și alți compuși care au legături macroergice sînt denumiți impropriu și „compuși macroergici”.

(în schema legăturii P~O din acidul pirofosforic este caracteristică de pirofosforică):

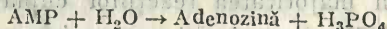


Dacă se ține seama de ionizarea în soluție (sau în mediul biologic), scindarea hidrolitică a ATP, în dependență de enzimele specifice, poate avea loc în două moduri: la ADP și acid fosforic sau la AMP și acid pirofosforic.



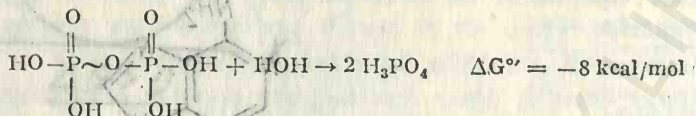
Caracterul „macroergic” al celor două legături P ~ O din ATP care se scindează hidrolitic constă în valoarea negativă ridicată a ΔG°. Pentru comparație se pot urmări în tabelul VI.1 valorile ΔG° în reacțiile de hidroliză ale zaharozei și glucozo-6-fosfatului; de altfel în majoritatea reacțiilor de hidroliză valorile ΔG° sînt mici. Cele două legături macroergice din ATP se notează cu simbolul ~. Se va vedea în continuare că pe lângă ATP un număr redus de alți compuși au astfel de legături.

A treia legătură P—O din ATP nu este macroergică; valoarea  $\Delta G^\circ$  la hidroliza acesteia, măsurată indirect în reacția:



este de numai  $-3,4 \text{ kcal/mol}$ .

În schimb legătura P~O din acidul pirofosforic este macroergică (în celule reacția aceasta este catalizată de pirofosfatază):

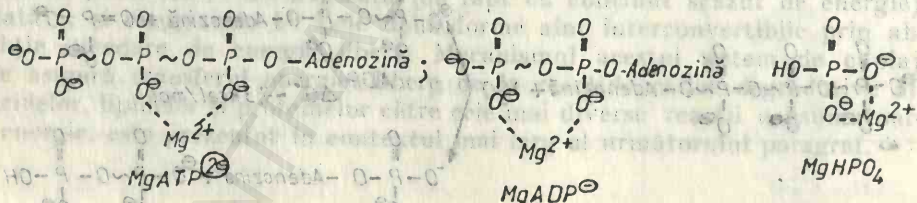


Există mai mulți factori care concură la obținerea unei valori negative ridicate a  $\Delta G^\circ$  în cursul hidrolizei legăturilor P~O din ATP și din pirofosfat:

— în primul rând, repulsia electrostatică: ATP-ul, la  $\text{pH} = 7$ , are patru sarcini negative care se resping mai puternic decât cele trei din ADP, respectiv cele două din acidul fosforic (situația este asemănătoare pentru pirofosfat în raport cu acidul fosforic);

— în al doilea rând, atât în ATP cât și în pirofosfat legăturile macroergice sînt de tip anhidridă (unesc două resturi acide). Stabilitatea acizilor care rezultă prin hidroliză este mult superioară anhidridelor deoarece există în mai multe forme mezoforme;

— un al treilea aspect este generat de prezența ionilor de  $\text{Mg}^{2+}$ ; în celule, atât ATP cât și ADP și  $\text{P}_i$  sînt complexați cu ioni de  $\text{Mg}^{2+}$ :

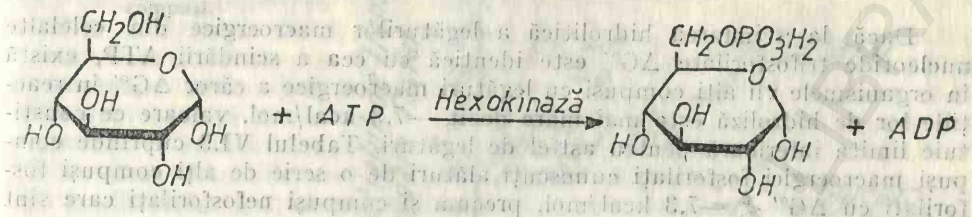


Deoarece afinitatea ADP pentru  $\text{Mg}^{2+}$  ( $K = 2,2 \cdot 10^3$ ) este de cca 6 ori mai mare decât afinitatea ATP ( $K = 3,8 \cdot 10^2$ ), reacția de hidroliză este „împinsă” spre formarea ADP și  $\text{P}_i$ .

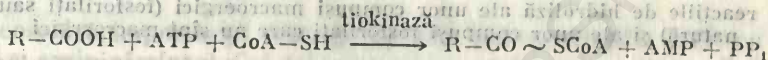
În majoritatea cazurilor cunoscute utilizarea ATP pentru procese anabolice sau alte procese consumatoare de energie constă în scindarea sa la ADP și  $\text{P}_i$ . Scindarea ATP la AMP și acid pirofosforic, urmată de scindarea rapidă a acestuia din urmă la acid fosforic este întâlnită mai rar, ea este însă avantajoasă din punct de vedere energetic ( $\Delta G_{\text{total}}^\circ = -15,3 \text{ kcal/mol}$ ); această scindare a ATP se realizează cînd reacția endergonică cuplată are  $\Delta G^\circ > 7,3 \text{ kcal/mol}$ . Pentru exemplificare se dau în continuare două cazuri de utilizare a ATP;



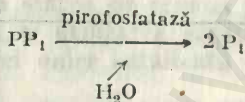
1. Fosforilarea glucozei, reacție care precedă atât căile catabolice cât și pe cele anabolice în care este utilizat acest compus glucidic; întrucât reacția necesită mai puțin de 7,3 kcal/mol este suficientă hidroliza ATP la ADP +  $P_i$ :



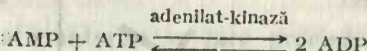
2. Activarea acizilor grași, constînd în trecerea lor în derivați acil-CoA, necesită mai mult de 7,3 kcal/mol; ATP-ul se scindează în acest caz la  $\text{AMP} + \text{PP}_i$ , pirofosfatul scindîndu-se rapid la  $2P_i$ :



acil-CoA



În timp ce ADP și  $P_i$  pot reforma direct ATP (vezi în continuare), sinteza ATP din AMP și  $\text{PP}_i$  nu este posibilă deoarece nu există o enzimă care să catalizeze această reacție. În mușchi, unde există enzima adenilatkinază din AMP și ATP se poate obține ADP prin reacția:

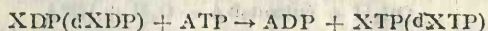


din ADP și  $P_i$  sintetizîndu-se apoi ATP.

## VI.7. ALȚI COMPUȘI MACROERGICI. POTENTIALUL DE TRANSFER AL GRUPĂRII FOSFAT

Rolul de intermediar energetic este îndeplinit în cele mai multe cazuri de sistemul ATP/ADP +  $P_i$  (sau ATP/AMP +  $\text{PP}_i$ ). Celelalte nucleotide trifosforilate pot servi în anumite cazuri drept compusi macroergici în locul ATP. Astfel, uridintrifosfatul (UTP) este utilizat în unele căi ale metabolismului glucidic la sinteza UDP-glucozei, CTP-ul activează unii compusi lipidici în timp ce la sinteza proteinelor participă atât ATP cât și GTP. În procesele de biosinteză ale acizilor nucleici, nucleotidele trifosforilate (ATP, GTP, UTP, CTP pentru ARN și dATP, dGTP, dCTP și dTTP pentru ADN) sînt, simultan, unitățile monomerice și furnizorii de energie. Cu o singură excep-

ție (se va vedea la prezentarea ciclului acizilor tricarboxilici), aceste nucleotide trifosforilate nu se sintetizează direct prin reacții  $\text{XDP} + \text{P}_i \rightarrow \text{XTP}$  ci prin reacții de schimb cu ATP-ul:



Dacă la scindarea hidrolitică a legăturilor macroergice din celelalte nucleotide trifosforilate  $\Delta G^\circ$  este identică cu cea a scindării ATP, există în organismele vii alți compuși cu legături macroergice a căror  $\Delta G^\circ$  în reacțiile lor de hidroliză este mai mare decât  $-7,3$  kcal/mol, valoare ce constituie limita inferioară pentru astfel de legături. Tabelul VI.3 cuprinde compuși macroergici fosforilați cunoscuți alături de o serie de alți compuși fosforilați cu  $\Delta G^\circ < -7,3$  kcal/mol, precum și compuși nefosforilați care sînt macroergici.

Tabelul VI.3

$\Delta G^\circ$  în reacțiile de hidroliză ale unor compuși macroergici (fosforilați sau de altă natură) și ale unor compuși fosforilați care nu sînt macroergici

Compușul	$\Delta G^\circ$	
	kcal/mol	kJ/mol
Acidul fosfoenolpiruvic	-14,8	-61,9
Carbamil-fosfatul	-12,3	-51,4
Acidul 1,3-difosfoglicerice	-11,8	-49,3
Creatin-fosfatul	-10,3	-43,1
Acil-CoA	-7,5	-31,4
ATP $\rightarrow$ ADP + $\text{P}_i$	-7,3	-30,5
Glucozo-1-fosfat	-5,0	-20,9
Fructozo-6-fosfat	-3,8	-15,9
Glucozo-6-fosfat	-3,3	-13,8
Glicerol-3-fosfat	-2,2	-9,2

Din disponerea pe baza  $\Delta G^\circ$  a ATP în mijlocul compușilor fosforilați reiese și mai bine rolul său de intermediar energetic („monedă de schimb“). Orice compus macroergic fosforilat cu  $\Delta G^\circ$  negativ mai mare decât  $-7,3$  kcal/mol poate transfera direct restul de acid fosforic ADP-ului formîndu-se ATP; acesta din urmă este capabil, la rîndul său să transfere restul de acid fosforic pe compușii situați mai jos în tabel. Se realizează astfel o scară de transfer a radicalului de acid fosforic numită „potențial de transfer a grupării fosfat“ care are o importanță covârșitoare în bioenergetică. Sistemul ATP/ADP este perechea ideală donor/acceptor de grupări fosfat tocmai pentru că este la mijlocul acestei scări. Transferul radicalului de acid fosforic este condiționat nu numai de valoarea lui  $\Delta G^\circ$  ci și de existența unor enzime specializate. Lipsa enzimelor corespunzătoare face imposibil transferul de radicali de acid fosforic între compușii macroergici situați deasupra ATP ca și de la aceștia la cei situați sub ATP (fig. VI.4).

Fosforilarea ADP cu  $\text{P}_i$  furnizat de compuși macroergici ca fosfoenolpiruvatul și acidul 1,3-difosfoglicerice reprezintă, după cum se va arăta în continuare, una din modalitățile curente de producere a ATP în sistemele vii.





însemnate de ATP raportat la un mol de compus degradat. În eforturi intense celulele musculare degradează glucoza și în condiții anaerobe. Eritrocitele sînt deci celule strict anaerobe în timp ce celulele musculare sînt „facultative“.

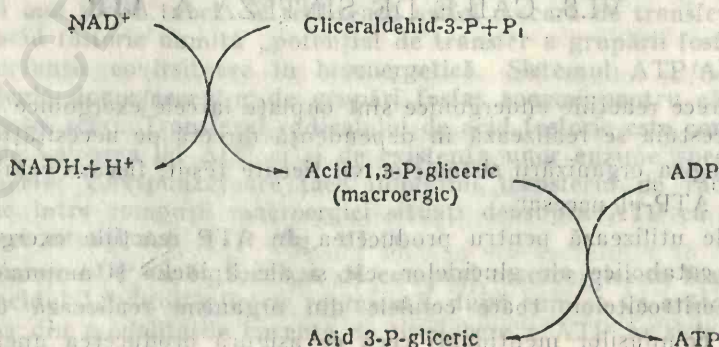
Cuprinzînd numai o parte din etapele căilor degradative aerobe, căile anaerobe produc puțină energie și deci puțin ATP. De ex. față de  $\Delta G^\circ = -685$  kcal/mol de glucoză degradată aerob, în etapele anaerobe  $\Delta G^\circ = -47$  kcal/mol. Producerea de ATP corelată cu degradarea anaerobă se realizează în întregime prin procesul numit „fosforilare la nivel de substrat“ în timp ce producerea de ATP corelată cu degradarea aerobă se realizează numai în mică măsură prin acest proces, în cea mai mare parte ea are loc prin cuplarea proceselor numite „lanț respirator“ și „fosforilare oxidativă“.

### VI.8.1. FOSFORILAREA LA NIVEL DE SUBSTRAT

Cînd energia eliberată într-o reacție exergonică care face parte dintr-o secvență degradativă este utilizată imediat pentru sinteza ATP-ului din ADP și  $P_i$  se spune că are loc o „fosforilare la nivel de substrat“.

Numai reacțiile exergonice care eliberează energie în valoare cel puțin egală cu aceea de hidroliză a legăturii macroergice din ATP, deci cu  $\Delta G^\circ \geq -7,3$  kcal/mol, pot asigura sinteza de ATP. Cuplarea ADP și  $P_i$  cu formarea legăturii macroergice este un proces catalizat prin enzime, kinazele care intervin avînd specificitatea absolută în raport cu substratul. Numărul kinazelor de acest tip care se cunosc este destul de mare dar în organismul uman operează numai trei, corespunzînd la tot atîtea reacții de sinteză a ATP la nivel de substrat. Două dintre ele sînt în legătură directă cu degradarea glucozei la acid piruic fiind operaționale atît în condiții anaerobe cît și aerobe; cea de a treia este corelată cu metabolizarea acetil ~ CoA în cadrul ciclului acizilor tricarboxilici. Ele sînt prezentate în continuare în legătură cu reacțiile ce le precedă în căile catabolice respective, reacții care asigură formarea compușilor macroergici.

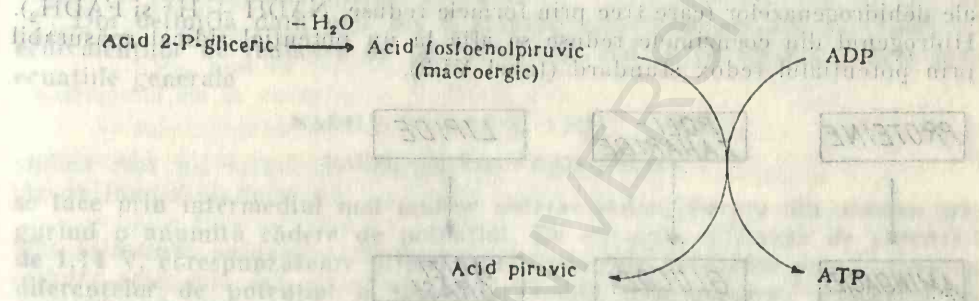
a. Sinteza de ATP cuplată cu transformarea acidului 1,3-difosfoglicerice în acid 3-fosfoglicerice :





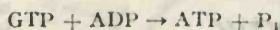
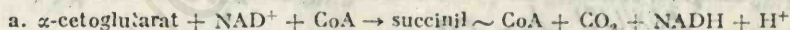
Transformarea gliceraldehid-3-fosfatului în acid 1,3-difosfoglicerice, care este compusul macroergic, are loc sub acțiunea gliceraldehid-3-fosfatdehidrogenazei (coenzimă  $\text{NAD}^+$ ). Mecanismul acestei reacții complexe va fi prezentat la metabolismul glucidic. Aici se menționează faptul că prin oxidarea propriu-zisă a grupării carbonil a gliceraldehid-3-fosfatului la grupare carboxil se eliberează circa 16 kcal/mol din care 11,8 sînt utilizate pentru formarea legăturii de tip anhidridă cu acidul fosforic. Prin transformarea rapidă a acidului 1,3-difosfoglicerice în acid 3-fosfoglicerice, restul de acid fosforic este trecut pe ADP. Din cele 11,8 kcal ale legăturii macroergice din acidul 1,3-difosfoglicerice 7,3 se conservă în legătura macroergică care se formează, restul de 4,5 kcal se disipează sub formă de căldură.

b. Al doilea caz, întîlnit tot în glicoliză, constă în sinteza de ATP cuplată cu transformarea acidului fosfoenolpiruvic în acid piruvic; ea este precedată de formarea acidului fosfoenolpiruvic din acid 2-fosfoglicerice:



Reacția care asigură formarea acidului fosfoenolpiruvic, este o deshidratare, fiind catalizată de enolază. În acidul fosfoenolpiruvic legătura macroergică nu este de tip anhidridă ci de tip ester; totuși la hidroliza acesteia  $\Delta G^{\circ} = -14,8$  kcal/mol valoarea cea mai ridicată a unei legături macroergice. Explicația ține de structura particulară a acidului fosfoenolpiruvic, el fiind de fapt esterul unui enol. Deși cele 14,8 kcal/mol ar fi suficiente pentru formarea în reacția următoare (catalizată de piruvatkinază) a doi moli de ATP în realitate nu se formează decît unul, 7,5 kcal dispîndu-se sub formă de căldură.

c. Sinteza de ATP cuplată cu decarboxilarea oxidativă a acidului  $\alpha$ -cetoglutaric este al treilea caz de fosforilare la nivel de substrat care se realizează în organismele animale. Procesul are loc la nivelul ciclului acizilor tricarboxilici. Cele două reacții sînt catalizate, în ordine, de complexul multienzimatic al  $\alpha$ -cetoglutarat dehidrogenazei și succinil  $\sim$ CoA sintetază:



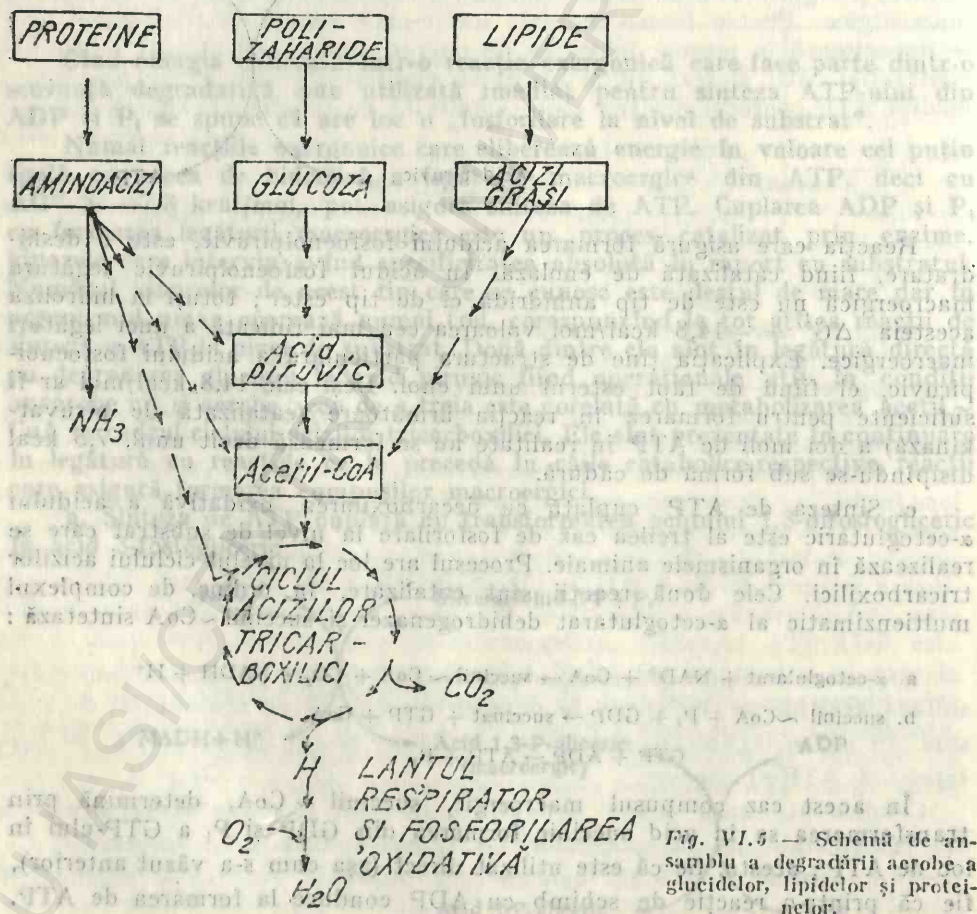
În acest caz compusul macroergic, succinil  $\sim$  CoA, determină prin transformarea sa în acid succinic formarea din GDP și  $\text{P}_i$  a GTP-ului în loc de ATP; acesta, fie că este utilizat direct (așa cum s-a văzut anterior), fie că printr-o reacție de schimb cu ADP conduce la formarea de ATP.

## VI.8.2. LANȚUL RESPIRATOR ȘI FOSFORILAREA OXIDATIVĂ

Reacțiile implicate în degradarea pînă la  $\text{CO}_2$  și  $\text{H}_2\text{O}$  a glucidelor, lipidelor și aminoacizilor de către organismele heterotrofe pot fi grupate în etape. Din fig. VI.5 se poate deduce că pînă la un anumit stadiu fiecare din compușii menționați se degradează pe o cale specifică în timp ce etapele finale ale degradării sînt comune:

Căile degradative comune sînt ciclul acizilor tricarboxilici și lanțul respirator; acesta din urmă funcționînd cuplat cu fosforilarea oxidativă.

Întrucît funcția lanțului respirator este strict corelată cu aceea a ciclului acizilor tricarboxilici, care va fi prezentat pe larg în capitolul „Metabolism glucidic”, se impun aici cîteva precizări: în sens catabolic ciclul acizilor tricarboxilici asigură degradarea moleculei de acetil-CoA (obținută prin degradările pe căi specifice ale glucidelor, lipidelor și unora dintre aminoacizi) la  $\text{CO}_2$  și hidrogen, ultimul fiind preluat de coenzimele  $\text{NAD}^+$  și  $\text{FAD}$  ale dehidrogenazelor (care trec prin formele reduse,  $\text{NADH} + \text{H}^+$  și  $\text{FADH}_2$ ). Hidrogenul din coenzimele reduse se află la un potențial ridicat, măsurabil prin potențialul redox standard (tabel VI.2).





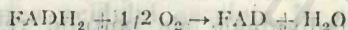
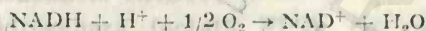
Lanțul respirator, etapa ultimă a degradării aerobe, se definește ca „ansamblul sistemelor redox și enzimelor care participă la transferul echivalenților reducători (atomi de hidrogen și electroni) de la coenzimele reduse la oxigen“. Funcția lanțului respirator este dublă :

— pe de o parte, prin transferul hidrogenului pe oxigen, cu formarea apei, coenzimele se reoxidează putînd astfel asigura în continuare dehidrogenările în căile degradative specifice și în special în ciclul acizilor tricarboxilici ;

— pe de altă parte, cînd coenzimele sînt reoxidate se eliberează energie și aceasta servește la sinteza de ATP.

Sinteza propriu-zisă a ATP se realizează prin procesul numit „fosforilare oxidativă“ care este cuplat cu lanțul respirator și care se definește drept „ansamblul compuşilor și mecanismelor care asigură formarea ATP din ADP și  $P_i$  pe seama energiei eliberate în cursul transferului echivalenților de reducere de la coenzimele reduse la oxigen“.

Din definiția dată mai sus a lanțului respirator rezultă că transferul echivalenților de reducere de pe coenzimele reduse pe oxigen, redată prin ecuațiile generale



se face prin intermediul mai multor sisteme redox, fiecare din acestea asigurînd o anumită cădere de potențial. De exemplu diferența de potențial de 1,14 V, corespunzătoare primei reacții generale, se obține prin însumarea diferențelor de potențial a sistemelor redox intermediare ; transferul în trepte a echivalenților de reducere este avantajos deoarece în mod corespunzător energia se eliberează în „pachete“ a căror valoare este în jurul lui  $-7,3$  kcal/mol cit necesită sinteza unui mol de ATP din ADP +  $P_i$ .

Lanțul respirator și fosforilarea oxidativă se desfășoară în *mitocondrii*, numite din acest motiv „sediu al puterii celulelor“. Mai exact, componentele lanțului respirator și fosforilării oxidative sînt incluse în membrana internă mitocondrială într-o ordine corespunzătoare descreșterii potențialului redox negativ și creșterii celui pozitiv. Transferul în lanț al echivalenților de reducere și sinteza de ATP sînt reprezentate în fig. VI.6.

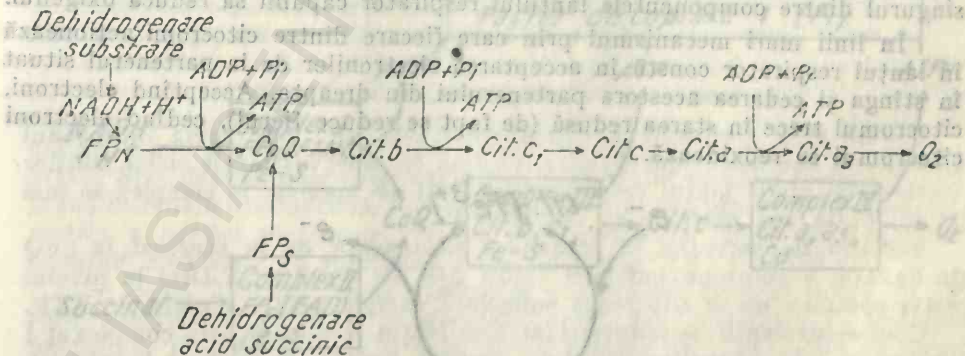


Fig. VI.6 — Transferul echivalenților de reducere în lanțul respirator și sinteza de ATP prin fosforilare oxidativă.

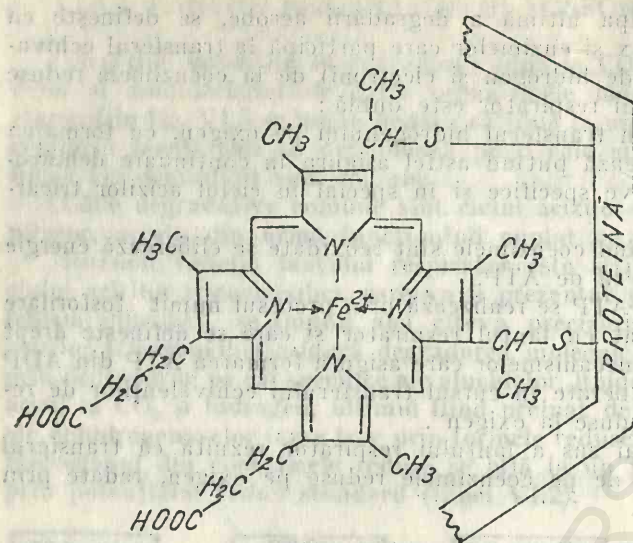


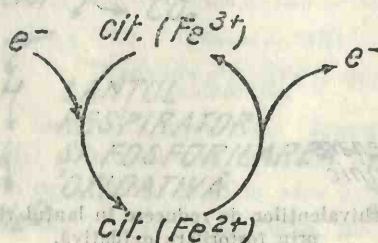
Fig. VI.7 — Structura citocromului C (componenta ne-proteică). Legătura cu proteina specifică se face prin intermediul grupărilor -SH ale unor resturi de cisteină.

Unele componente individuale ale lanțului respirator au fost izolate și structura lor s-a putut determina. Altele au fost studiate numai pe căi indirecte.

Citocromii sînt compuși heteroproteici a căror grupare prostetică este hemul (vezi cap. „Metabolismul hemoproteinelor“). Cel mai bine studiat este citocromul c, care este deosebit de stabil, legătura între hem și componenta proteică fiind covalentă. O proprietate deosebit de importantă a citocromilor este absorbția selectivă a unor radiații din domeniul vizibil al spectrului radiațiilor electromagnetice: clasificarea citocromilor în a, b, c și alții s-a realizat după acest criteriu. Tot pe baza spectrelor de absorbție ale citocromilor în stare redusă și oxidată s-a stabilit mecanismul de funcționare a lanțului respirator. În fig. VI.7 se dă structura cit. c (forma redusă).

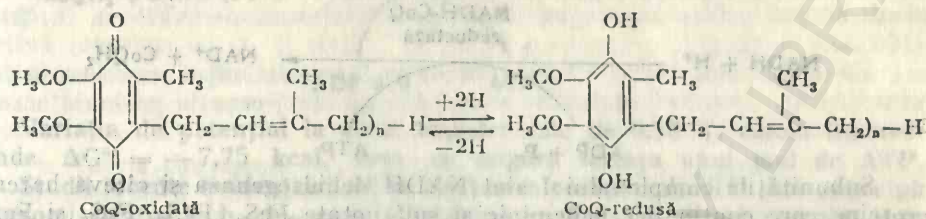
Citocromul a și a<sub>3</sub>, unități distincte după spectrele de absorbție înregistrate pe fragmente de membrană internă mitocondrială, nu au putut fi totuși separați unul de altul. Împreună ei alcătuiesc citocrom-c-oxidaza, singurul dintre componentele lanțului respirator capabil să reducă oxigenul.

În linii mari mecanismul prin care fiecare dintre citocromi acționează în lanțul respirator constă în acceptarea electronilor de la partenerul situat în stînga și cedarea acestora partenerului din dreapta. Acceptînd electroni, citocromul trece în starea redusă (de fapt se reduce fierul), cedînd electroni citocromul se reoxidează.





Coenzima Q (CoQ), numită și ubiquinonă, are, comparativ cu ceilalți componenți ai lanțului respirator, o moleculă mult mai mică. Seamănă, structural și funcțional, cu vitaminele K. Există de fapt mai multe CoQ care diferă prin lungimea catenei izoprenoide; CoQ există în formă redusă și oxidată; ea acționează în lanțul respirator acceptând și cedind hidrogen:



Flavoproteinele (FP) sînt componente ale lanțului respirator prin intermediul cărora se preiau hidrogenii de la coenzimele dehidrogenazelor sau direct de la substrat reduse. Cele mai importante flavoproteine sînt:

— FP<sub>N</sub>, numită NADH dehidrogenază, cu coenzima FMN, care preia hidrogenul de la coenzimele NADH;

— succinatdehidrogenaza (notată FP<sub>S</sub>), cu coenzimă de tip FAD; realizează dehidrogenarea acidului succinic în ciclul acizilor tricarboxilici și introducerea hidrogenilor în lanțul respirator;

— alte flavoproteine cu coenzimă de tip FAD care preiau hidrogenul de la diverse substrat introducîndu-l în lanțul respirator.

Cercetări recente au evidențiat, pe de o parte, că numărul componentelor participante la lanțul respirator este mai mare decît cele cuprinse în fig. VI.6; pe de altă parte, componentele se grupează în complexe. Funcționarea cuplată a lanțului respirator și fosforilării oxidative este asigurată de cinci complexe: I, II, III, IV și factorul de cuplare 1; cit. c și CoQ nu fac parte din complexe dar asigură legături între acestea (fig. VI.8).

Complexul I, numit și NADH-CoQ-reductază transferă ionii de H<sup>+</sup> și electronii de la NADH la coenzima Q. Căderii de potențial de 0,42 V (care reprezintă diferența între E<sub>0</sub> a NADH și E<sub>0</sub> a CoQ) îi corespunde o

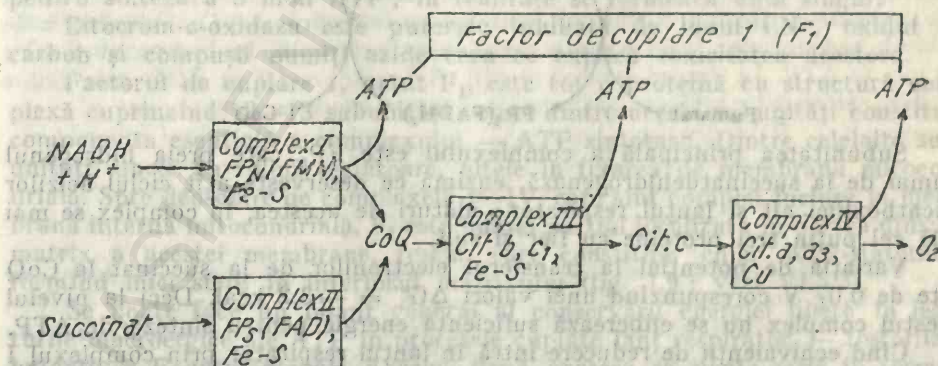
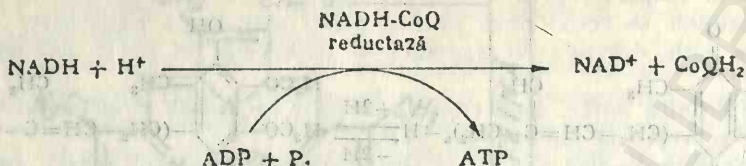


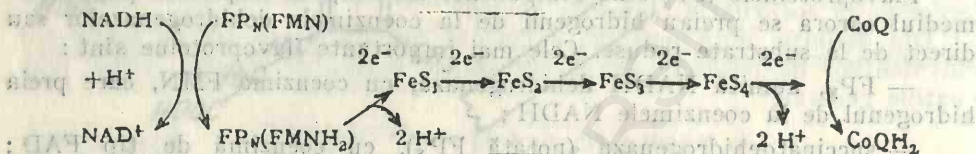
Fig. VI.8 — Complexele lanțului respirator și fosforilării oxidative.

$\Delta G^{\circ} = -19,4$  kcal/mol, suficientă pentru sinteza de 2 moli de ATP; în procesul fosforilării oxidative se sintetizează însă un singur mol de ATP, restul energiei dispărându-se sub formă de căldură.

Reacțiile catalizate de complexul NADH-CoQ-reductază și cuplarea cu fosforilarea oxidativă pot fi sumarizate astfel:



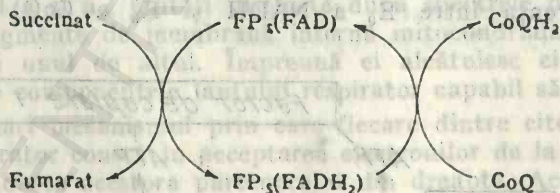
Subunitățile complexului I sînt NADH dehidrogenază și cîteva heteroproteine care conțin fier neheminic și sulf notate  $\text{FeS}_1$ ,  $\text{FeS}_2$ ,  $\text{FeS}_3$  și  $\text{FeS}_4$ , această ordine corespunzînd descreșterii lui  $E_0$ :



Se observă că hidrogenul este disproporțional imediat după preluarea sa de către complex, echivalenții de reducere transferați în continuare fiind electronii; transferul se asigură prin oxidări-reduceri ale ionilor de fier și de sulf ai subunităților. Eliberarea protonilor este absolut necesară pentru cuplarea lanțului respirator cu fosforilarea oxidativă, așa cum va rezulta, în continuare.

Complexul I este inhibat de rotenonă (un insecticid de origine vegetală), amital (compus din clasa barbituricelor) și pericidină (antibiotic), substanțe care, blocînd transferul de electroni, sînt otrăvuri deosebit de puternice.

Complexul II, numit și succinat-coenzimă-Q-reductază, realizează transferul echivalenților de reducere de la succinat la coenzima Q conform ecuației generale:



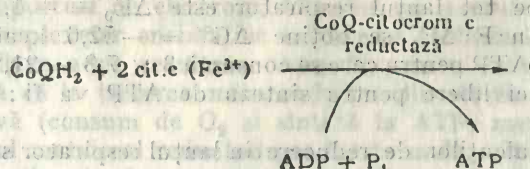
Subunitatea principală a complexului este  $\text{FP}_3$  care preia hidrogenul numai de la succinatdehidrogenază, enzimă ce deservește atît ciclul acizilor tricarboxilici cît și lanțul respirator; alături de acestea, în complex se mai află cel puțin trei proteine cu fier și sulf.

Variația de potențial la transferul electronilor de la succinat la CoQ este de 0,07 V corespunzînd unei valori  $\Delta G^{\circ} = -3,2$  kcal. Deci la nivelul acestui complex nu se eliberează suficientă energie pentru sinteza de ATP.

Cînd echivalenții de reducere intră în lanțul respirator prin complexul I se spune că lanțul funcționează prin „ramura lungă”, în timp ce la intrarea echivalenților prin complexul II lanțul funcționează prin „ramura scurtă”.



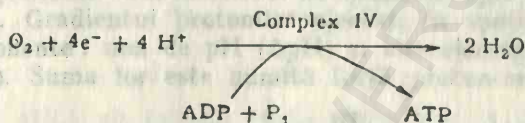
Complexul III, numit CoQ-citocrom-c-reductază, asigură transferul echivalenților de reducere (tot sub formă de electroni) de la CoQ la citocromul c:



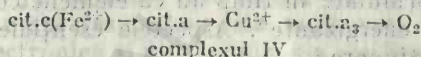
Variația de potențial la acest transfer este de 0,18 V, căreia îi corespunde  $\Delta G^\circ = -7,75$  kcal, ceea ce asigură sinteza unui mol de ATP.

Studii recente evidențiază că la alcătuirea complexului III mai participă citocromi de tip b, b<sub>k</sub>, b<sub>L</sub>, c<sub>1</sub> și o proteină cu Fe și S. Acest complex este inhibat specific de antibioticul antimicină A.

Complexul IV, numit citocromoxidază, catalizează adăugarea a 4 electroni la oxigenul molecular cu formarea a 2O<sup>2-</sup>, care combinându-se cu protonii, formează apă:



Structura și mecanismul de acțiune a acestui complex, singurul din cei patru, capabil să transfere electroni oxigenului molecular, nu sînt încă pe deplin cunoscute. Se știe că este alcătuit din 7 subunități a căror compoziție în aminoacizi este diferită. Unele din acestea conțin ioni de Cu<sup>2+</sup>. Raportul între cit. a/cit. a<sub>3</sub>/Cu este de 1/1/2. Curgerea electronilor în complex este în sensul:



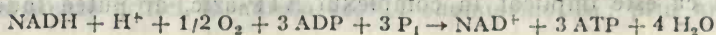
deci citocromul a<sub>3</sub> este cel care reduce oxigenul.

Căderii de potențial de 0,54 V în cursul transferului electronilor de la cit. c la O<sub>2</sub> îi corespunde o valoare  $\Delta G^\circ = -21,8$  kcal, deci energie suficientă pentru sinteza a 3 moli ATP; în realitate se formează unul singur.

Citocrom-c-oxidaza este puternic inhibată de ionul CN<sup>-</sup>, oxidul de carbon și compuși numiți azide ceea ce explică toxicitatea acestora.

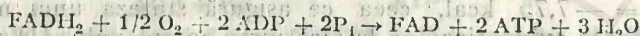
Factorul de cuplare 1, notat F<sub>1</sub>, este tot o proteină cu structură complexă cuprinzînd 12—13 subunități; cinci dintre aceste subunități constituie componenta esențială a complexului — ATP sintetaza. Dintre celelalte subunități, unele au roluri reglatoare, altele în fixarea de membrana mitocondrială. Spre deosebire de complexe I—IV, care sînt complet incluse în membrana internă mitocondrială, F<sub>1</sub> este numai parțial localizată în partea dinspre matrix a acestei membrane, restul, care constituie chiar ATP-sintetaza, formînd mici sfere în interiorul matrixului (fig. 1.9; vezi VI.8.3).

Se poate face un bilanț general al conservării energiei libere în legăturile macroergice ale ATP în procesele cuplate lanț respirator — fosforilare oxidativă. Ecuația globală a celor două procese se poate scrie în forma:



Din datele din tabelul I.2 rezultă că  $E_0$  pentru  $\text{NAD}^+/\text{NADH} + \text{H}^+ = -0,32 \text{ V}$ , iar pentru sistemul  $\text{O}_2/2\text{O}^{2-}$   $E_0' = +0,82 \text{ V}$ . Deci variația potențialului redox standard pe tot lanțul respirator este  $\Delta E_0' = +1,14 \text{ V}$ . Aplicând formula  $\Delta G^\circ = -n \cdot F \cdot \Delta E_0'$  se obține  $\Delta G^\circ = -52,6 \text{ kcal/mol}$ . Întrucât se sintetizează 3 moli ATP pentru care se consumă  $3 \times 7,3 = 21,9 \text{ kcal}$  randamentul utilizării energiei libere pentru sinteza de ATP va fi:  $21,9 \cdot 100/52,6 = 42\%$ .

Dacă introducerea echivalenților de reducere în lanțul respirator se face prin  $\text{FADH}_2$  (ramura „scurtă” a lanțului respirator) ecuația generală a celor două procese cuplate este:



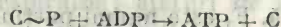
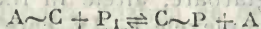
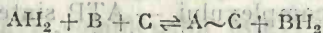
deci se produce numai doi moli de ATP pentru reducerea unui atom-gram de oxigen.

Raportul între numărul de moli de ATP produși și oxigenul consumat în lanțul respirator este numit „cît de fosforilare”. El se simbolizează P/O și este 3/1 pentru ramura lungă și 2/1 pentru ramura scurtă a lanțului respirator.

### VI.8.3. TEORII PRIVIND MECANISMUL FOSFORILĂRII OXIDATIVE

Una din problemele fundamentale ale bioenergeticii o constituie elucidarea mecanismului prin care energia eliberată în cursul transportului electronilor de la NADH la oxigen este cuplată la sinteza de ATP din ADP și  $\text{P}_i$ . Cele trei teorii formulate în timp au ca element comun existența intermediară a unei „stări energizante”. Aspectele esențiale ale celor trei teorii sînt prezentate în continuare:

a. În teoria chimică numită și a intermediarilor comuni (Slater, 1953), prin analogie cu fosforilarea la nivel de substrat, se presupune că variația energiei libere în cursul trecerii electronilor de la un intermediar redus ( $\text{AH}_2$ ) al lanțului respirator la următorul oxidat (B) servește la cuplarea lui A cu un compus C pentru a forma legătura macroergică  $\text{A} \sim \text{C}$ . În reacții de schimb secvențiale, legătura macroergică este trecută în compusul  $\text{C} \sim \text{P}$ ; de aici în ATP. În timpul acestor reacții,  $\text{AH}_2$  este oxidat la A, B este redus la  $\text{BH}_2$  și C este refăcut putîndu-se iniția o nouă secvență:



Celor trei cuplaje ale lanțului respirator cu fosforilarea oxidativă ar trebui să le corespundă trei intermediari  $\text{A} \sim \text{C}$ . Nici un asemenea compus nu a fost identificat. Abandonată din acest motiv, teoria cuplajului chimic a fost reluată (Griffiths, 1977) considerîndu-se că acidul lipoic, care s-a constatat că este implicat în complexul ATP-azic, ar putea îndeplini rolul lui C.



b. Teoria conformațională, în forma inițială (Boyer, 1964), consideră că energia eliberată în cursul transportului electronilor este conservată prin modificarea conformațională la o stare energizată a unuia sau mai multor transporturi de electroni. Ulterior s-a postulat modificarea conformațională a complexelor enzimactice la care se realizează cuplajul. În sprijinul acestei teorii se aduc rezultate obținute prin microscopia electronică care evidențiază că la trecerea mitocondriilor din starea de repaus metabolic la starea activă (consum de  $O_2$  și sinteză la ATP) membrana internă se pliază, volumul matriceal reducându-se foarte mult. Viteza redusă a modificărilor conformaționale în raport cu rapiditatea cuplajului transport de electroni-sinteză de ATP este un serios impediment în impunerea acestei teorii.

c. Teoria chemiosmotică (Mitchell, 1961) postulează că starea intermediară energizată care determină sinteza ATP din ADP și  $P_i$  își are originea în gradientul de protoni ce se stabilește între fața interioară și cea exterioară a membranei interne mitocondriale în timpul transportului de electroni.

Energia eliberată în reacțiile de oxido-reducere ale lanțului respirator servește la pomparea  $H^+$  din interiorul mitocondriei spre exterior (în schimb cu alți cationi). Gradientul protonilor ejectați în spațiul intermembranar are două componente: una de pH ( $\Delta pH$ ) și una electrică sau potențial de membrană ( $\Delta\psi$ ). Suma lor este numită forță proton-motrice ( $\Delta p$ ):

$$\Delta p = \Delta\psi - 2,303 \frac{RT}{F} \cdot \Delta pH$$

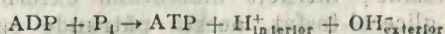
În alți termeni, energia eliberată prin circulația orientată a electronilor este inițial stocată în gradientul de potențial electrochimic al protonilor.

Date experimentale numeroase vin în sprijinul acestei teorii. Astfel existența unui potențial transmembranar, care constituie cheia ipotezei chemiosmotice, are justificarea prin aceea că spațiul intermembranar al mitocondriilor în cursul respirației este mult mai acid. Pe de altă parte, prin microscopia electronică și alte tehnici s-a confirmat și faptul, obligatoriu în teoria lui Mitchell, că membrana internă mitocondrială este străbătută de la o față la alta de complexe care alcătuiesc lanțul respirator (fig. VI.9).

În continuare, teoria prevede că protonii din spațiul intermembranar revin în mitocondrie strict prin interiorul factorului  $F_1$  care este un „conductor” pentru protoni (restul membranei fiind impermeabilă pentru protoni). Tocmai acest flux de protoni este forța motrice care determină sinteza de ATP din ADP și  $P_i$ .

În experiențe model s-a putut demonstra că un flux artificial de protoni, în absența lanțului respirator, poate determina cuplarea ADP cu  $P_i$ , ceea ce constituie încă un argument serios în favoarea acestei teorii.

Unul din postulatele teoriei chemiosmotice prevede că apa rezultată în reacția de formare a ATP din ADP și  $P_i$  se ionizează spontan, ionii  $H^+$  fiind „dirijați” spre interiorul mitocondriei (ei urmînd să creeze gradientul protonic) în timp ce ionii  $OH^-$  sînt dirijați spre spațiul intermembranar:



Această producere „anizotropă” a apei a constituit obiectul principal al unor înverșunate critici la adresa teoriei chemiosmotice; prin argumentele

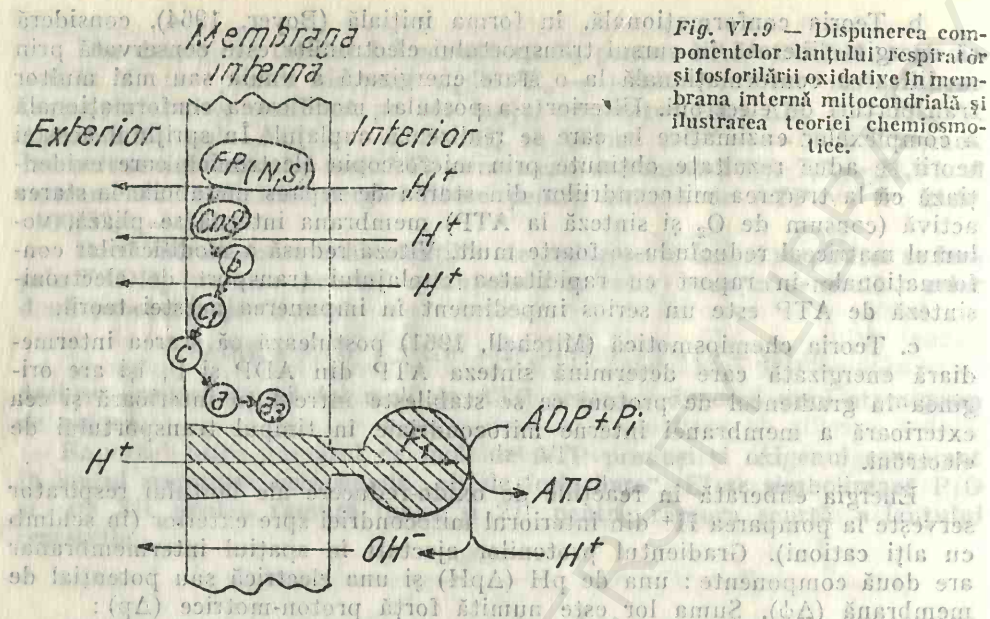


Fig. VI.9 — Dispunerea componentelor lanțului respirator și fosforilării oxidative în membrana internă mitocondrială și ilustrarea teoriei chimiosmotice.

deja menționate ca și prin altele aduse ulterior de către Mitchell și alți cercetători, această teorie s-a impus net în raport cu teoria chimică și cu teoria conformațională.

### Sisteme de transport a echivalenților de reducere (navete)

Reacții de dehidrogenare catalizate de dehidrogenaze cu coenzimă  $\text{NAD}^+$  au loc atât în citoplasma cit și în mitocondriile celulelor.  $\text{NADH} + \text{H}^+$  care se produce în astfel de reacții la nivelul mitocondriilor se reoxidează prin introducerea directă a echivalenților de reducere în lanțul respirator (mecanismul deseris). Mai complicată este reoxidarea  $\text{NADH} + \text{H}^+$  care se produce în citoplasmă. Exceptând anumite cazuri de ex. reoxidarea  $\text{NADH} + \text{H}^+$  produs în cursul oxidării gliceraldehid-3-fosfat  $\rightarrow$  acid 3-fosfoglicerice în reacția acid piruvic  $\rightarrow$  acid lactic; (vezi glicoliza anaerobă) și  $\text{NADH} + \text{H}^+$  produs în citoplasmă se reoxidează prin introducerea echivalenților de reducere în lanțul respirator. Cum însă membrana mitocondrială nu este permeabilă pentru coenzime nicotinamidice, procesul are loc pe căi indirecte care au fost denumite „navete” (shuttle).

Naveta „glicerol-fosfat” (fig. VI.10. A) operează astfel:  $\text{NADH} + \text{H}^+$  format în diverse reacții de reducere din citoplasmă se asociază cu apoenzima specifică formind glicerol-fosfatdehidrogenaza, enzimă ce catalizează reacția de hidrogenare a dihidroxiacetonfosfatului (DHAP, intermediar glicolic) la glicerol-fosfat; întrucât membrana externă mitocondrială este permeabilă pentru glicerol-fosfat, acesta pătrunde cu ușurință în spațiul intermembranar. Pe suprafața externă a membranei interne mitocondriale este localizată glicerol-fosfatdehidrogenaza mitocondrială, care reoxidează glicerol-fosfatul la DHAP, cei doi atomi de hidrogen fiind preluați de coen-



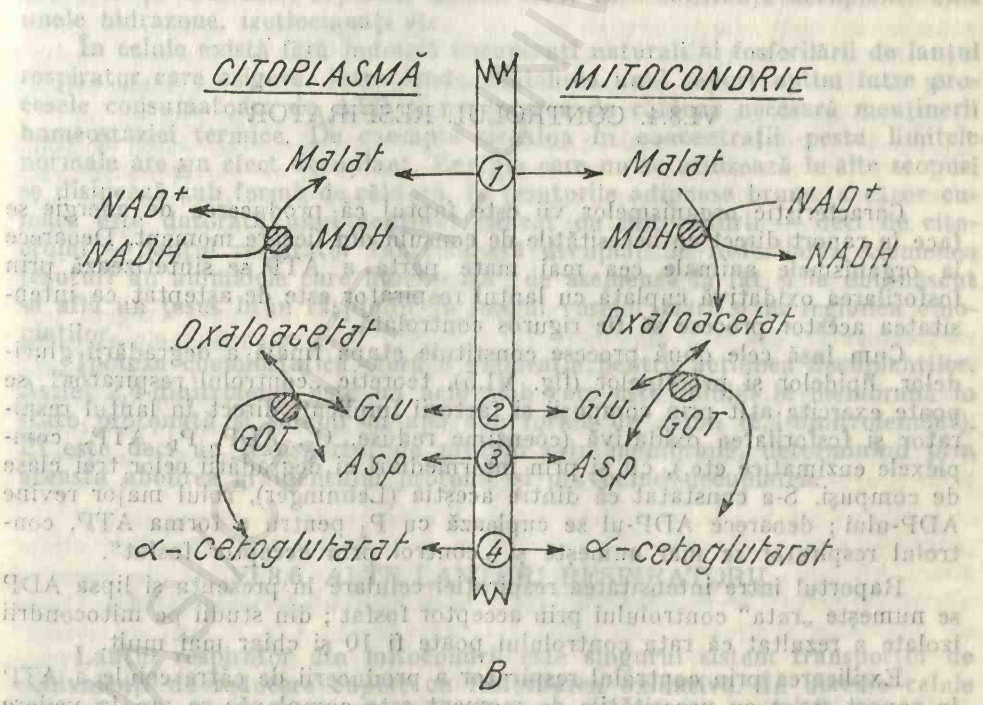


Fig. VI.10 — A. Navea unidirecțională „glicerol-fosfat”; B. Transferul bidirecțional „malat-aspartat”.

zima acestei enzime, care este de tip flavinic (FP). De pe aceasta hidrogenii sînt preluați de lanțul respirator prin intermediul CoQ; DHAP revine în citoplasmă și suita de reacții se reia.

Acțiunea navetei glicerol-fosfat este restrînsă la introducerea echivalenților de reducere de pe  $\text{NADH} + \text{H}^+$  citoplasmatic în lanțul respirator. Ea este deci monodirecțională și are drept scop menținerea în citoplasmă a concentrației necesare de  $\text{NAD}^+$  cit și producerea de ATP la nivelul lanțului respirator cuplat cu fosforilarea oxidativă pe seama reacțiilor de dehidrogenare din citoplasmă.

Printr-un mecanism și mai complicat operează naveta „malat-aspartat” (fig. VI.10. B); la transferul în sensul citoplasmă  $\rightarrow$  mitocondrie sau mitocondrie  $\rightarrow$  citoplasmă (naveta este deci de tip bidirecțional) a echivalenților de reducere concură malatdehidrogenazele (MDH) și aspartat-glutamamino-transferazele (GOT) citoplasmatic și mitocondriale precum și transportori specializați pentru transferul prin membrana internă mitocondrială a malatului, glutamului, aspartatului și  $\alpha$ -cetoglutaratului (notați pe figură, în ordine, 1, 2, 3 și 4). Prin acțiunea acestei navete se asigură atît reoxidarea  $\text{NADH} + \text{H}^+$  citoplasmatic, cit și, pe plan mai general, reglarea cuplurilor  $\text{NADH} - \text{NAD}^+$  extra- și intramitocondriale.

Alte navete sînt capabile să realizeze schimb de echivalenți de reducere cu participarea și a coenzimelor NADP. Una dintre ele este responsabilă de formarea în citoplasmă a unor mari cantități de  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  necesare pentru biosinteze, în special de lipide.

#### VI.8.4. CONTROLUL RESPIRATOR

Caracteristic organismelor vii este faptul că producerea de energie se face în raport direct cu necesitățile de consum din fiecare moment. Deoarece la organisme animale cea mai mare parte a ATP se sintetizează prin fosforilarea oxidativă cuplată cu lanțul respirator este de așteptat ca intensitatea acestor procese să fie riguros controlată.

Cum însă cele două procese constituie etapa finală a degradării glucidelor, lipidelor și proteinelor (fig. VI.5), teoretic „controlul respirator” se poate exercita atît prin compuși și factorii implicați direct în lanțul respirator și fosforilarea oxidativă (coenzime reduse,  $\text{O}_2$ , ADP,  $\text{P}_i$ , ATP, complexe enzimatice etc.), cit și prin intermediari ai degradării celor trei clase de compuși. S-a constatat că dintre aceștia (Lehninger), rolul major revine ADP-ului; deoarece ADP-ul se cuplează cu  $\text{P}_i$  pentru a forma ATP, controlul respirator se mai numește și „control prin acceptor fosfat”.

Raportul între intensitatea respirației celulare în prezența și lipsa ADP se numește „rata” controlului prin acceptor fosfat; din studii pe mitocondrii izolate a rezultat că rata controlului poate fi 10 și chiar mai mult.

Explicarea prin controlul respirator a producerii de către celule a ATP în raport strict cu necesitățile de moment este complexă: se are în vedere pe de o parte că factorul de cuplare 1 este prezent în mitocondri în cantități limitate astfel încît în absența ADP-ului acesta va rămîne blocat, în forma



sa energizată; pe de altă parte, se are în vedere intensitatea fluxului protonic prin ATP-sintetază, flux reglat în fiecare moment prin raportul ADP/ATP; în sfârșit, cum va reieși din capitolele următoare, ADP este modulator pentru numeroase enzime din căile degradative ale glucidelor, lipidelor și proteinelor.

De aici decurge faptul, extrem de important, că ATP nu joacă în celule rol de rezervor de energie, ci, așa cum s-a mai arătat, numai de intermediar energetic.

#### VI.8.5. DECUPLANȚI AI FOSFORILĂRII OXIDATIVE DE LANȚUL RESPIRATOR

Prin cuplarea lanțului respirator cu fosforilarea oxidativă se asigură utilizarea a circa 42% din energia eliberată pentru sinteza de ATP (în condiții standard). Aceasta se exprimă și prin cîșt de fosforilare  $P/O = 3/1$ .

Se numesc decuplanți agenții care blochează utilizarea pentru fosforilarea ADP a energiei eliberate în lanțul respirator. Ei „decuplează” oxidarea de fosforilare.

Decuplantul clasic este 2,4-dinitrofenolul. Prezent într-o concentrație de numai 10  $\mu M$ , el determină o diminuare a raportului  $P/O$  cu 50%; la concentrații mai mari raportul devine zero. Alte substanțe decuplante sînt unele hidrazone, izotiocianați etc.

În celule există fără îndoială decuplanți naturali ai fosforilării de lanțul respirator care asigură, între altele, stabilirea unui raport optim între procesele consumatoare de ATP și producerea de căldură necesară menținerii homeostaziei termice. De exemplu tiroxina în concentrații peste limitele normale are un efect decuplant. Energia care nu se utilizează în alte scopuri se disipează sub formă de căldură. În țesuturile adipoase brune, a căror culoare este datorată unui conținut ridicat de mitocondrii — deci de citocromi — lanțul respirator funcționează decuplat de fosforilare. Asemenea țesuturi au animalele care hibernează; de asemenea la făt și la nou-născut se află un țesut brun răspîndit în lungul vaselor mari și în regiunea omoplaților.

Ipoteza chimiostatică oferă o explicație pentru acțiunea decuplanților. Astfel 2,4-dinitrofenol este un acid slab care este solubil în membrană în stare protonată și solubil în apă sub formă de anion (2,4-dinitrofenolat). El este deci un transportor de protoni prin membrană, determinînd prin aceasta abolirea gradientului protonic și provocînd decuplarea.

#### VI.8.6. ALTE LANȚURI RESPIRATORII

Lanțul respirator din mitocondrii este singurul sistem transportor de echivalenți de reducere cuplat cu fosforilarea oxidativă. În diverse celule animale există diferite variante de lanțuri transportoare al căror rol este restrîns la reducerea  $O_2$  în vederea încorporării în anumiți compuși chimici. Cele mai frecvente cazuri le reprezintă procesele de hidroxilare:





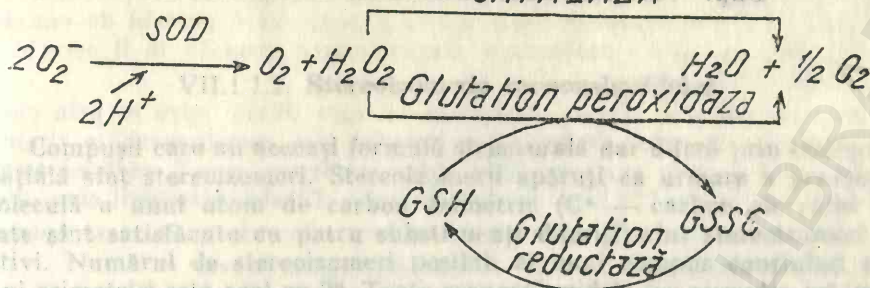
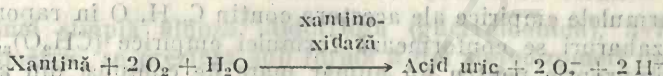


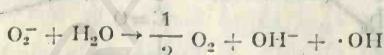
Fig. VI.12. Sistemul enzimatic de apărare împotriva speciilor toxice ale  $O_2$ .

respirator din mitocondrii. Sisteme generatoare de radicali superoxid există și în membrana plasmatică, în peroxizomi cit și în citosol. O reacție în cursul căreia se formează însemnate cantități de ioni superoxid este aceea de oxidare a xantinei la acid uric în prezența xantinoxidazei:



Anionul superoxid, cu caracter de radical, are o mare reactivitate putînd interacționa cu proteinele, acizii nucleici, lipidele membranare etc. la nivelul cărora se produc modificări ireversibile care se traduc prin inactivarea unor enzime, mutații, modificări în ciclul celular, modificarea permeabilității membranelor, oxidarea acizilor grași și a colesterolului etc.

Pe de altă parte, anionul superoxid generează alte specii moleculare și radicali liberi cu toxicitate foarte mare ca: apa oxigenată și radicalul hidroxil ( $\cdot OH$ ):



Celulele dispun însă de enzime și alți compuși care asigură o îndepărtare extrem de rapidă a ionului superoxid și a celorlalte specii reactive generate din acesta (fig. VI.12).

Alături de superoxidismutază, catalază, glutathionperoxidază și glutathionreductază, care apar în fig. VI.12, sistemul de apărare celular cuprinde vitaminele A, E, C și alți antioxidanți.

Evenimentele, la nivel molecular, ale unor procese patologice ca inflamația, ischemia, malignizarea, se interpretează în prezent și prin acțiunea, primară sau secundară, a speciilor reactive ale oxigenului. Totodată aceste specii și în primul rînd radicalul hidroxil se generează în cursul iradierilor masive cu raze X și  $\gamma$ . Depășirea capacității de protecție a sistemelor de apărare are consecințe extrem de grave.

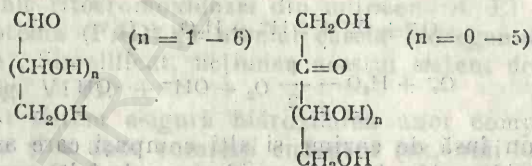
## Cap. VII. METABOLISMUL GLUCIDELOR

### VII.1. CHIMIA GLUCIDELOR

Glucidele sau zaharurile sînt compuși polihidroxycarbonilici și derivați ai acestora. Numele de hidrați de carbon, care se mai folosește încă, sugerează că formulele empirice ale acestora conțin C, H, O în raport de 1/2/1. Deși multe zaharuri se conformează formulei empirice  $(CH_2O)_n$ , denumirea s-a dovedit improprie pentru un număr mare de compuși din această clasă care conțin alt raport al atomilor de C, H, O sau conțin în plus azot, sulf, fosfor.

Glucidele se împart în oze și ozide, după comportarea la hidroliză.

Ozele, sau monozaharidele, sau zaharurile simple, conțin o singură unitate polihidroxycarbonilică (sînt deci nehidrolizabile). După natura grupării reducătoare carbonil din moleculă, se împart în aldoze și cetoze, iar după numărul atomilor de carbon se împart în trioze, tetroze, pentoze, hexoze, heptoze, octoze :



Cele mai importante și abundente sînt hexozele (glucoză, fructoză, galactoză) și pentozele (riboză).

Ozidele se împart, după numărul de unități monozaharidice la care dau naștere prin hidroliză, în oligozide și poliozide.

Oligozidele sau oligozaharidele sînt constituite dintr-un număr relativ mic de unități monozaharidice (între 2 și 10) legate covalent. Dintre oligozaharidele care se găsesc în țesuturile animale și vegetale ca atare, cele mai frecvente sînt : zaharoza, lactoza, maltoza. Oligozaharidele, constituite din mai multe subunități monozaharidice, nu se găsesc libere, ci formează lanțurile laterale ale unor catene polipeptidice din structura glicoproteinelor.

Polizaharidele conțin un număr mare de unități monozaharidice (de ordinul sutelor sau mîilor) pe care le pot elibera prin hidroliză. Polizaharidele cele mai răspîndite în regnul vegetal sînt amidonul și celuloza, iar în regnul animal, glicogenul.

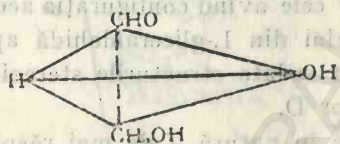


## VII.1.1. MONOZAHARIDELE

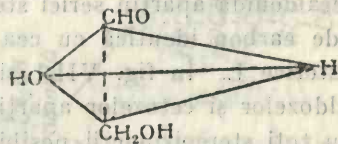
### VII.1.1.1. Stereoizomeria monozaharidelor

Compușii care au aceeași formulă structurală dar diferă prin configurația spațială sînt stereoizomeri. Stereoizomerii aparūți ca urmare a prezenței în moleculă a unui atom de carbon asimetric ( $C^*$  — carbon ale cărei covalențe sînt satisfăcute cu patru substituenți diferiți) sînt stereoizomeri optic activi. Numărul de stereoizomeri posibili ai unui compus conținînd  $n$  carboni asimetrici este egal cu  $2^n$ . Toate monozaharidele (cu excepția cetotriozei, respectiv dihidroxiacetona) conțin în moleculă atomi de carbon asimetrici, fiind optic active. Prezența unui  $C^*$  într-o moleculă face ca aceasta să poată exista în două configurații diferite, nesuperpozabile, comportîndu-se una față de alta ca obiectul și imaginea sa în oglindă, ca mîna dreaptă față de cea stîngă. Moleculele ozelor sînt deci molecule chirale (chiro = mîna), avînd ca centru chiralic, de asimetrie, unul sau mai mulți atomi de carbon asimetrici.

Cea mai simplă aldoză, aldotrioza (gliceraldehida), avînd un singur carbon asimetric, se prezintă sub forma a doi stereoizomeri optic activi care se deosebesc între ei exclusiv prin sensul în care rotesc planul luminii polarizate (au aceleași proprietăți fizice și chimice). Acești doi stereoizomeri optic activi poartă numele de enantiomeri și se găsesc unul față de celălalt ca obiectul față de imaginea sa în oglindă. Prin convenție, cei doi stereoizomeri ai gliceraldehidei au fost desemnați D și L. Configurația absolută a celor patru substituenți în jurul carbonului asimetric, stabilită prin studii de difracție a razelor X, este redată prin formulele de perspectivă și plane:

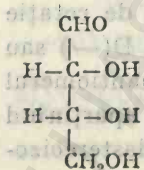


D-gliceraldehida

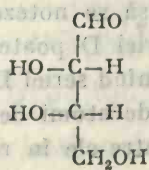


L-gliceraldehida

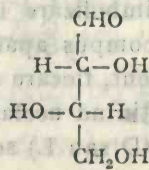
Aldotetrozele, conținînd două centre de chiralitate (doi carboni asimetrici), se prezintă sub forma a  $2^2$  (patru) stereoizomeri optic activi care formează două perechi de enantiomeri (I și II):



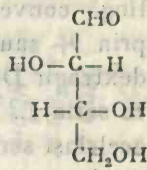
I



:



II



Aldopentozele conținând 3 atomi de carbon asimetrici se prezintă sub forma a  $2^3 = 8$  stereozomeri optic activi grupați în 4 perechi de enantiomeri. Similar, există 16 aldohexoze stereozomere grupate în 8 perechi de enantiomeri.

Așa cum s-a mai arătat, stereozomerii care diferă între ei prin configurația tuturor atomilor de carbon asimetrici sînt enantiomeri, în timp ce aceia care diferă prin configurația a unu, maximum  $n - 1$  carboni asimetrici (din totalul de  $n$   $C^*$ ), sînt diastereozomeri. Diastereozomerii care diferă prin configurația unui singur atom de carbon asimetric se numesc epimeri. Schimbarea configurației unui  $C^*$  se numește epimerizare.

Enantiomerii se deosebesc între ei exclusiv prin sensul de rotație a planului luminii polarizate, unghiul de rotație fiind același. Amestecul echimolecular al celor doi enantiomeri, dextrogir și levogir, constituie un racemic. Sinteza organică dă naștere la racemici, optic inactivi, în timp ce natura sintetizează numai unul sau altul dintre enantiomeri grație stereospecificității enzimelor implicate în sinteză.

Diastereozomerii se deosebesc între ei prin proprietățile chimice și fizice, precum și prin valoarea unghiului sau sensul de rotație a planului luminii polarizate.

Din motive de sistematizare, compușii optic activi s-au împărțit în două serii sterice, D și L, după înrudirea configurațională cu un compus de referință care este gliceraldehida (vezi și aminoacizii). Se consideră că monozaharidele avînd configurația atomului de carbon asimetric cel mai depărtat de gruparea carbonil identică cu cea a carbonului asimetric din D-gliceraldehidă aparțin seriei sterice D, iar cele avînd configurația aceluiași atom de carbon identică cu cea a carbonului din L-gliceraldehidă aparțin seriei sterice L. În fig. VII.1 și VII.2 sînt redată structurile stereozomerilor aldozelor și cetozele aparținînd seriilor D.

Nu toți stereozomerii posibili se găsesc în natură. Cele mai răspîndite și importante din punct de vedere biologic sînt aldozele D-riboză, D-glucoză, D-galactoză și D-manoză și cetozele D-ribuloză și D-fructoză (numele cetozele se formează în general inserînd „ul” în numele aldozei corespunzătoare). În natură se găsesc și zaharuri aparținînd seriei L, cele mai importante și răspîndite fiind L-fucoza și L-sorboza. De subliniat că apartenența la seria D sau L nu exprimă sensul de rotație a planului luminii polarizate de către zahărul respectiv, ci se referă la configurația absolută a atomului de  $C^*$  cel mai depărtat de gruparea carbonil. Din acest motiv este necesar ca, pe lîngă convenția de simbolizare D sau L, să se noteze și sensul de rotație prin + sau —. Un compus aparținînd seriei D poate fi levogir D(—) sau dextrogir D(+). Evident, fiecare oză aparținînd seriei D își află enantiomerul în seria L. Ozele conținînd același număr de atomi de carbon și aparținînd aceleiași serii sterice (D sau L) se găsesc între ele în relație de diastereozomerie.



Monozaharidele naturale aparțin seriei D. Glucoza naturală este D-(+) glucoza și are un unghi de rotație +52°. Glucoza naturală este D-(-), fructoza are un unghi de rotație -92°.

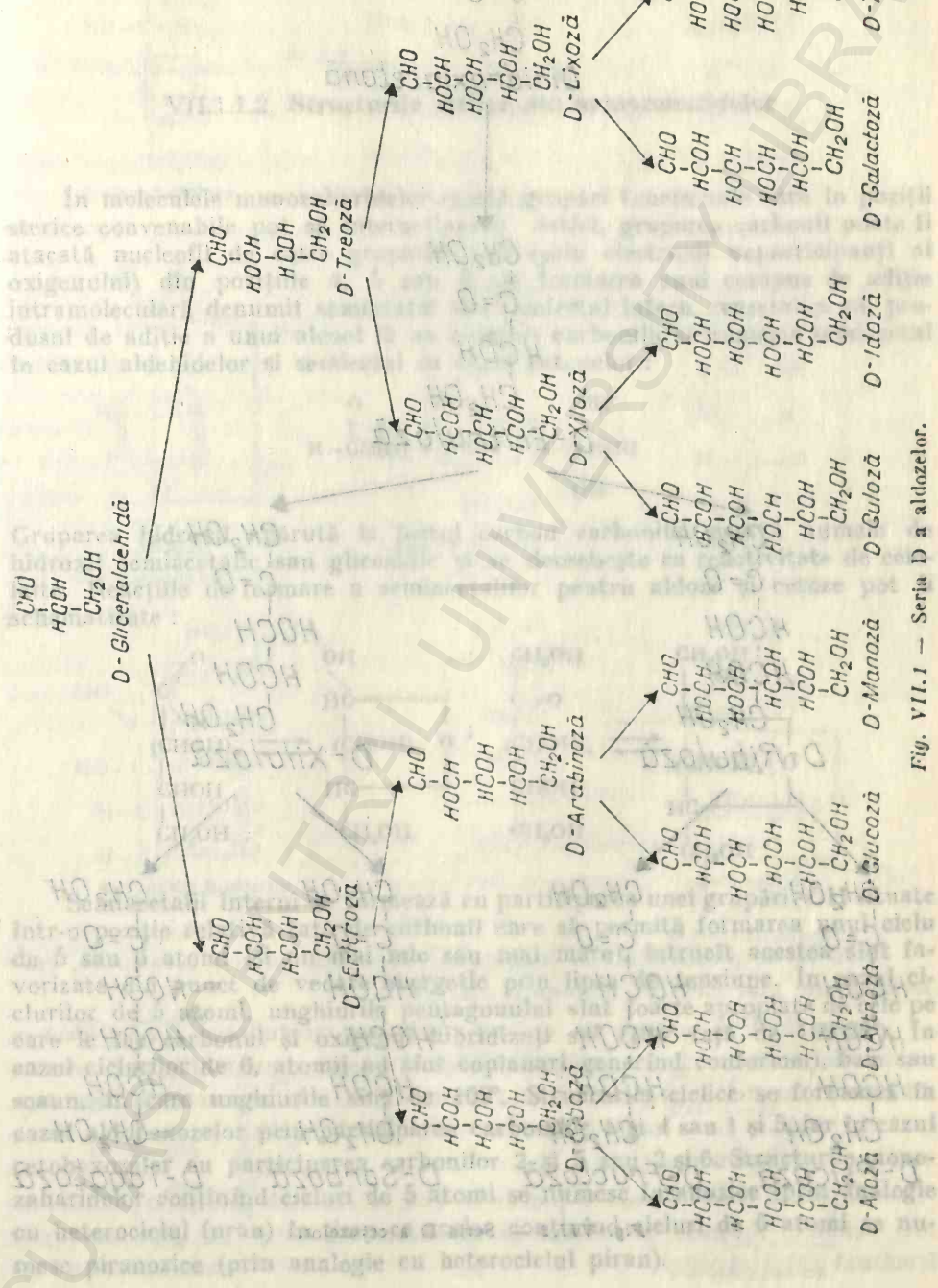


Fig. VII.1 — Seria D a aldazelor.

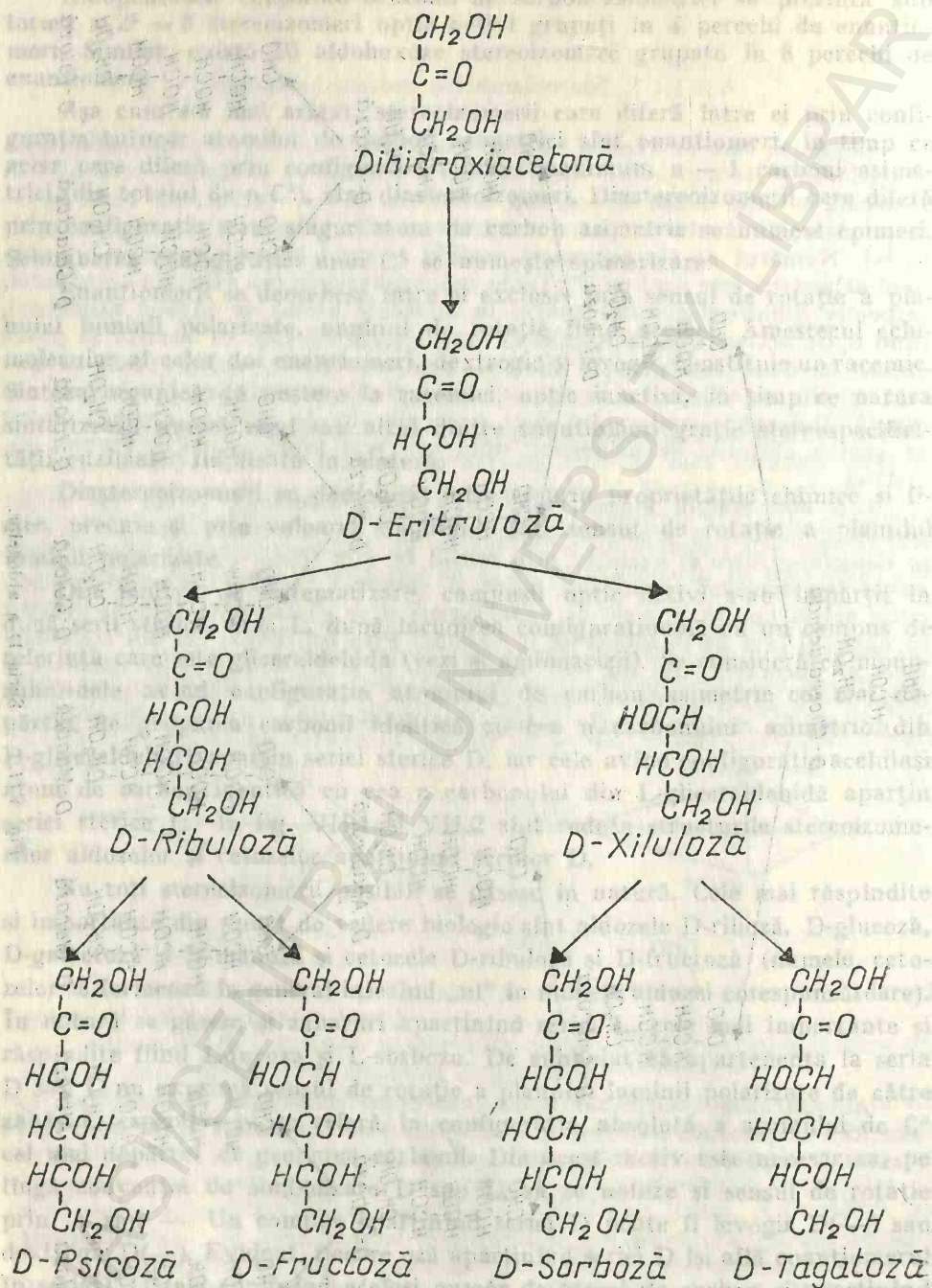


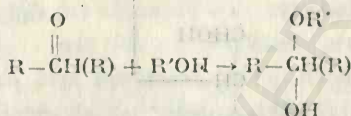
Fig. VII.2 — Seria D a cetozeilor.



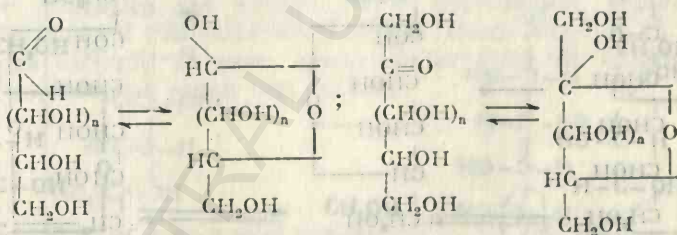
Monozaharidele naturale aparțin în general seriei D. Glucoza naturală este D(+) glucoza și are un unghi de rotație de  $+52,7^\circ$ , în timp ce fructoza naturală este D(—), fructoza avind un unghi de rotație de  $-92,4^\circ$ .

### VII.1.1.2. Structurile ciclice ale monozaharidelor

În moleculele monozaharidelor există grupări funcționale care în poziții sterice convenabile pot să interacționeze. Astfel, gruparea carbonil poate fi atacată nucleofil de către grupările OH (prin electronii neparticipanți ai oxigenului) din pozițiile 4, 5 sau 6 cu formarea unui compus de adiție intramoleculară denumit semiacetal sau semicetal intern, reamintim că, produsul de adiție a unui alcool la un compus carbonilic se numește semiacetal în cazul alchidelor și semicetal în cazul cetonelor :

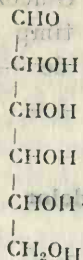


Gruparea hidroxil apărută la fostul carbon carbonilic poartă numele de hidroxil semiacetalic sau glicozidic și se deosebește ca reactivitate de celelalte. Reacțiile de formare a semiacetalilor pentru aldoze și cetoze pot fi schematizate :

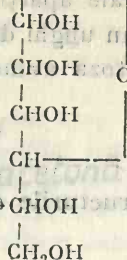


Semiacetalii interni se formează cu participarea unei grupări -OH situate într-o poziție relativă față de carbonil care să permită formarea unui ciclu de 5 sau 6 atomi (și nu mai mic sau mai mare), întrucât acestea sunt favorizate din punct de vedere energetic prin lipsa de tensiune. În cazul ciclurilor de 5 atomi, unghiurile pentagonului sunt foarte apropiate de cele pe care le face carbonul și oxigenul hibridizați  $sp^3$  ( $108^\circ$  față de  $109^\circ 28'$ ). În cazul ciclurilor de 6, atomii nu sunt coplanari, generind conformeri, baie sau scaun, în care unghiurile sunt de  $109^\circ$ . Structurile ciclice se formează în cazul aldohexozelor prin participarea carbonilor 1 și 4 sau 1 și 5, iar în cazul cetohehexozelor cu participarea carbonilor 2 și 5 sau 2 și 6. Structurile monozaharidelor conținând cicluri de 5 atomi se numesc furanozice (prin analogie cu heterociclul furan) în timp ce acelea conținând cicluri de 6 atomi se numesc piranozice (prin analogie cu heterociclul piran).

Monosaharidele naturale aparțin în general seriei D. Glucoza naturală este D-(+)-glucoza și are un unghi de rotație de +52.7° în soluție apoasă la 20°C. Fructoza este D-(-)-fructoza și are un unghi de rotație de -92.1° în soluție apoasă la 20°C.



aldehexoză



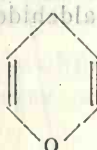
str. furanozică



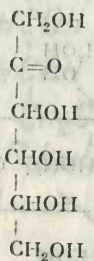
furan



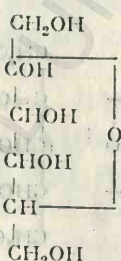
str. piranozică



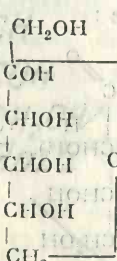
piran



cetohehexoză



structură furanozică



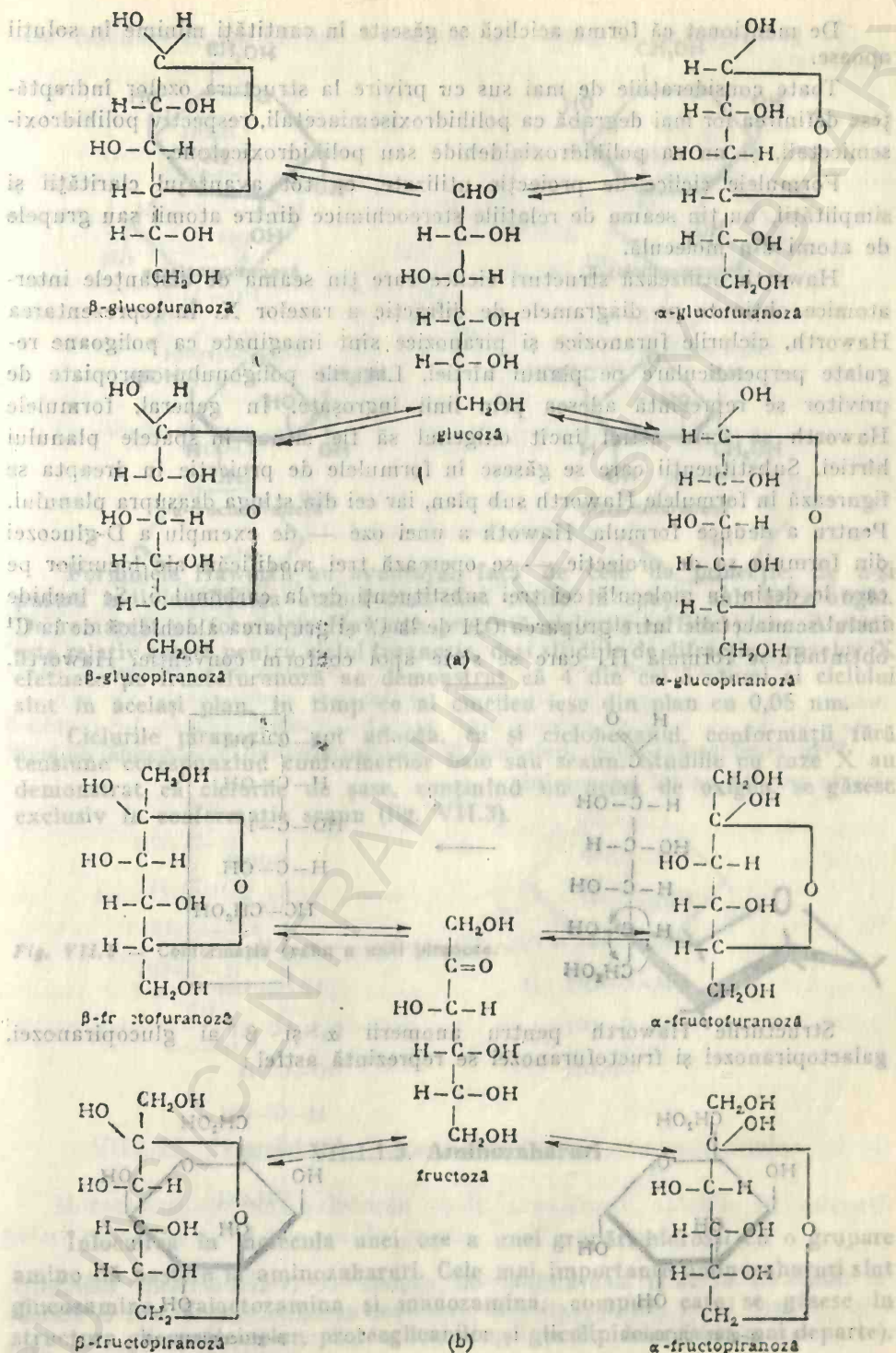
structură piranozică

Structurile piranozice sînt mai stabile în soluție ca cele furanozice, care se întîlnesc mai ales în combinații ale ozelor.

Ca urmare a reacției de ciclizare prin semiacetalizare, fostul carbon carbonilic devine carbon asimetric, putînd să adopte două configurații stereice diferite. Apar doi stereoisomeri supranumerari numiți anomeri, în care atomul de carbon care leagă gruparea —OH semiacetalică poate avea două configurații (anomeri  $\alpha$  și  $\beta$ ).

Cele două forme anomere pot trece una în cealaltă prin intermediul formei aciclice. Formele piranozice și furanozice ( $\alpha$  și  $\beta$ ) ale glucozei (a) și fructozei (b) sînt :



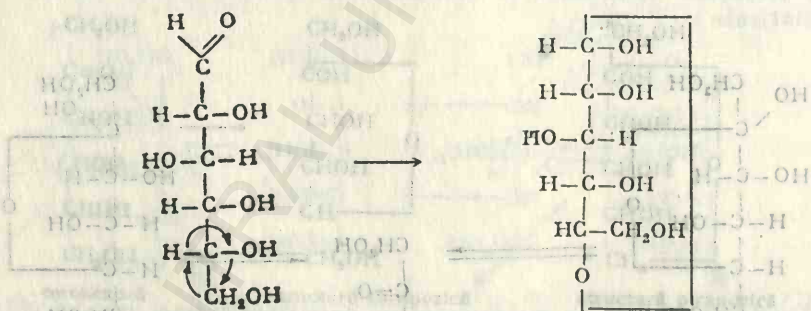


De menționat că forma aciclică se găsește în cantități minime în soluții apoase.

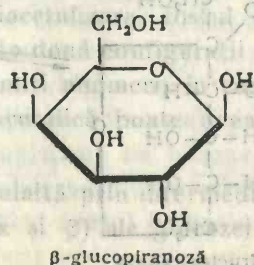
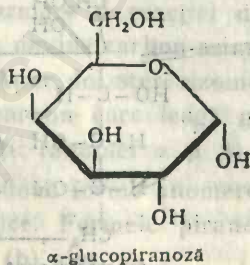
Toate considerațiile de mai sus cu privire la structura ozelor îndreptătesc definirea lor mai degrabă ca polihidroxisemiactalii, respectiv polihidroxisemicetali, și nu ca polihidroxialdehide sau polihidroxicetone.

Formulele ciclice de proiecție utilizate, cu tot avantajul clarității și simplității, nu țin seama de relațiile stereochemice dintre atomii sau grupele de atomi din moleculă.

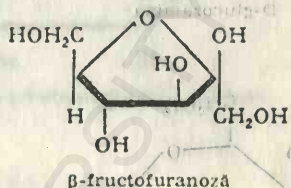
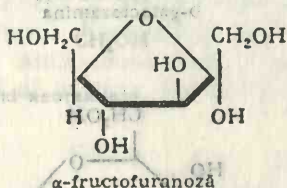
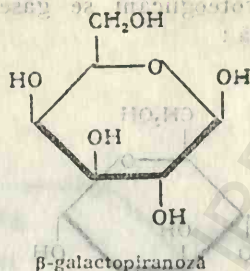
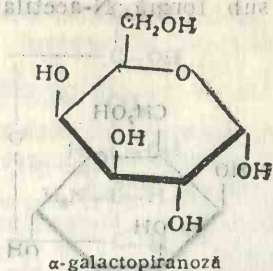
Haworth utilizează structuri ciclice care țin seama de distanțele interatomice obținute pe diagramele de difracție a razelor X. În reprezentarea Haworth, ciclurile furanozice și piranozice sînt imaginate ca poligoane regulate perpendiculare pe planul hîrtiei. Laturile poligonului apropiate de privitor se reprezintă adesea prin linii îngroșate. În general, formulele Haworth se scriu astfel încît oxigenul să fie situat în spatele planului hîrtiei. Substituenții care se găsesc în formulele de proiecție în dreapta se figurează în formulele Haworth sub plan, iar cei din stînga deasupra planului. Pentru a deduce formula Haworth a unei oze — de exemplu a D-glucosei din formula sa de proiecție — se operează trei modificări ale locurilor pe care le dețin în moleculă cei trei substituenți de la carbonul 5. Se închide inelul semiactalic între gruparea OH de la C<sup>5</sup> și gruparea aldehydică de la C<sup>1</sup> obținîndu-se formula III care se scrie apoi conform convenției Haworth.



Structurile Haworth pentru anomerii  $\alpha$  și  $\beta$  ai glucopiranozei, galactopiranozei și fructofuranozei se reprezintă astfel:



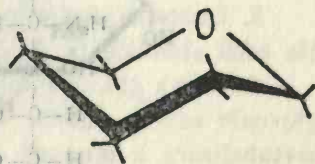




Formulele Haworth au avantajul, față de cele de proiecție, de a-și păstra individualitatea atunci când sînt rotite în spațiu sub orice unghi. De remarcă că formulele Haworth prezintă ciclurile ca fiind plane. Aceasta este relativ corect pentru ciclul furanozic, deși studiile de difracție a razelor X efectuate pe fructofuranoză au demonstrat că 4 din cei 5 atomi ai ciclului sînt în același plan, în timp ce al cincilea iese din plan cu 0,05 nm.

Ciclurile piranozice pot adopta, ca și ciclohexanul, conformații fără tensiune corespunzînd conformerilor baie sau scaun. Studiile cu raze X au demonstrat că ciclurile de șase, conținînd un atom de oxigen, se găsesc exclusiv în conformație scaun (fig. VII.3).

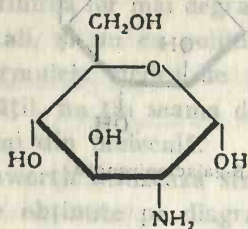
Fig. VII.3 — Conformația scaun a unei piranoze.



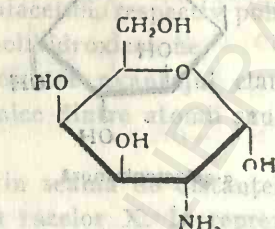
### VII.1.1.3. Aminozaharuri

Înlocuirea în moleculă unei oze a unei grupări hidroxiil cu o grupare amino dă naștere la aminozaharuri. Cele mai importante aminozaharuri sînt glucozamina, galactozamina și manozamina, compuși care se găsesc în structura glicoproteinelor, proteoglicanilor și glicolipidelor (vezi mai departe).

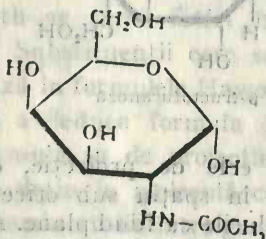
În proteoglicani se găsesc cu precădere sub formă N-acetilată sau N-sulfată :



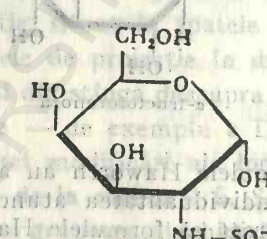
D-glucosamina



D-galactosamina

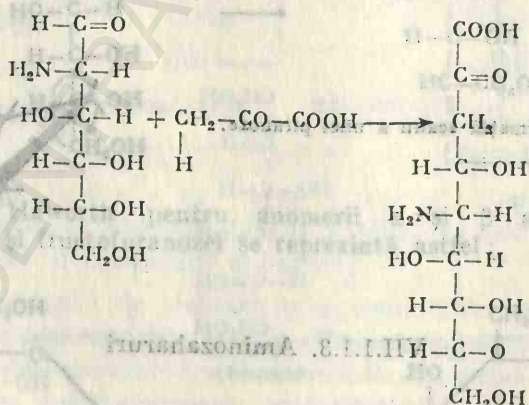


N-acetil-galactosamina



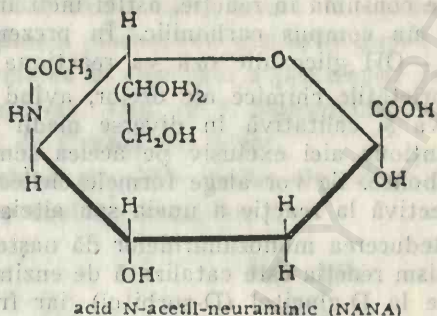
N-sulfatul-galactosaminel

Prin condensarea unei molecule de manozamină cu o moleculă de acid piruvic rezultă acidul neuraminic :



Acilarea acidului neuraminic dă naștere la N-acil-derivați denumiți acizi siălici. Dacă restul acil este un rest acetil rezultă acidul N-acetil-neuraminic (NANA), constituent principal al glicoproteinelor :

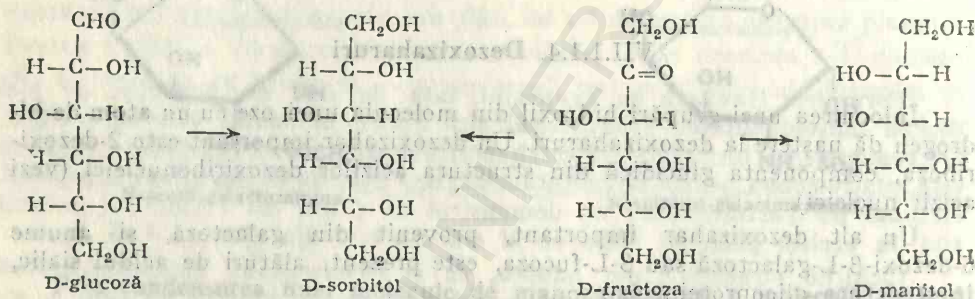




În soluție, diversele forme ciclice coexistă cu forma aciclică, chiar dacă aceasta din urmă nu depășește 0,02%. În prezența unui reactant specific grupării  $\text{>C=O}$  echilibrul se deplasează spre forma aciclică pe măsură ce aceasta se consumă în reacție, astfel încât întreaga cantitate de oză va reacționa ca un compus carbonilic. În prezența unor reactanți caracteristici grupării  $\text{—OH}$  glicozidic oza va reacționa sub formă ciclică.

Proprietățile chimice ale ozelor, avînd interes pentru determinarea lor cantitativă și calitativă în diverse medii biologice, nu vor fi prezentate. Vom menționa aici exclusiv pe acelea semnificative pentru transformările lor metabolice. Se vor alege formele ciclice sau aciclice, funcție de participarea efectivă la reacție a uneia sau alteia dintre ele.

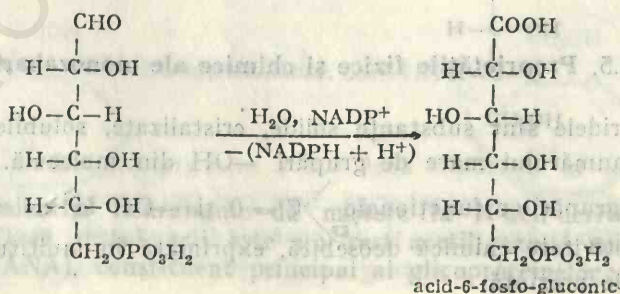
1. Reducerea monozaharidelor dă naștere la polialcoolii corespunzători. În organism reacția este catalizată de enzime NADH dependente. D-glucosa se reduce la D-glucitol (D-sorbitol), iar fructoza dă naștere la doi polioli diastereoizomeri: D-sorbitol și D-manitol:



Se consideră că în diabetul zaharat s-ar forma mari cantități de sorbitol, prin excelență în retină, ceea ce ar contribui la instalarea retinopatiei diabetice.

2. Oxidarea ozelor poate decurge fie la gruparea carbonil, cînd se obțin acizi aldonici, fie la gruparea alcool primar, cînd se obțin acizi uronici.

Oxidarea glucozei sub formă de ester glucozo-6-fosforic la acid 6-fosfogluconic este o reacție catalizată enzimatic cu care debutează o cale de metabolizare a glucozei avînd ca scop obținerea de pentoze (vezi șuntul pentozelor). Ca acceptor de hidrogen funcționează  $\text{NADP}^+$ .

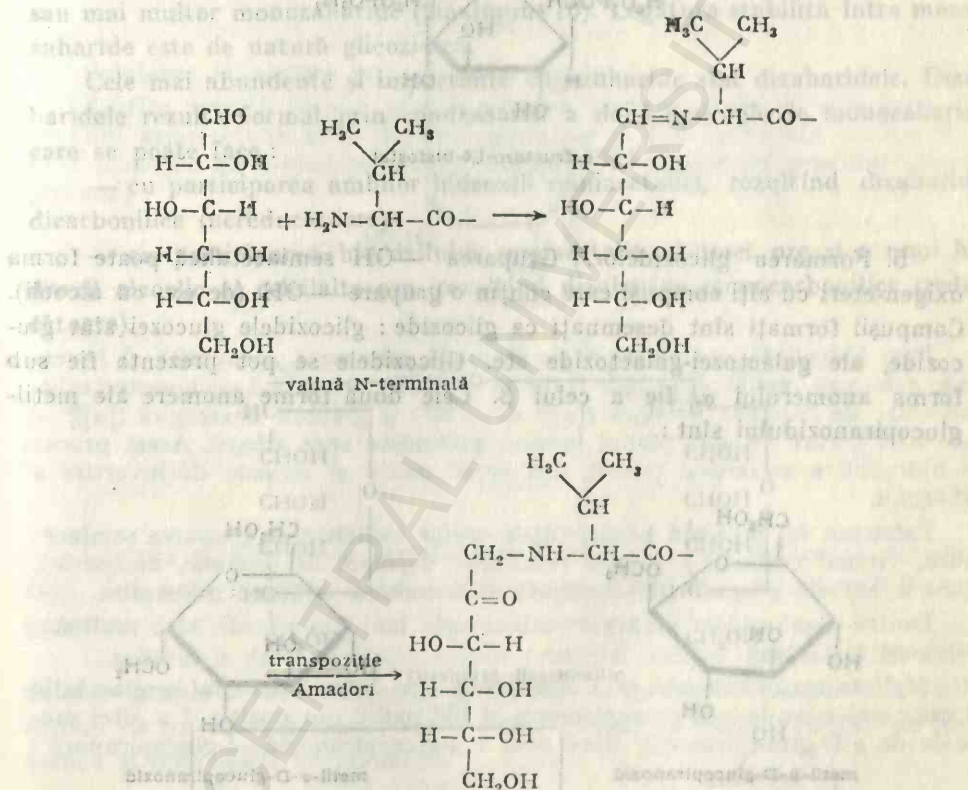




Oxidarea energetică a grupării alcool primar duce la acid glucuronic și reprezintă o reacție importantă utilizată în procesele de detoxifiere sau în sinteza unor proteoglicani ce conțin în structura lor acid glucuronic (vezi calea acizilor uronici).

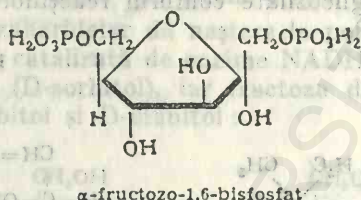
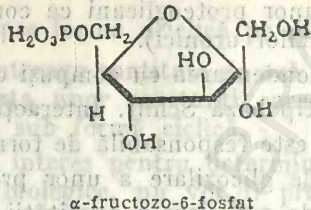
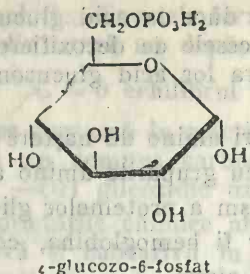
3. Condensarea cu compuși conținând grupări amino dă naștere la compuși de tip bază Schiff. Interacțiunea glucozei cu grupările amino ale unor proteine este responsabilă de formarea în organism a proteinelor glicozilate. Gradul de glicozilare a unor proteine, cum ar fi hemoglobina, constituie un test de apreciere a cantității de glucoză din sânge.

Se consideră că în hemoglobină grupările amino ale valinei terminale de pe lanțurile  $\beta$  sînt glicozilate conform reacțiilor :

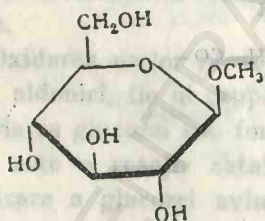


Alterarea, prin glicozilare, a unor proteine în diabetul zaharat este incriminată în nefropatia, neuropatia, retinopatia diabetică.

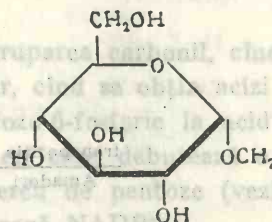
4. Esterificarea ozelor cu acid fosforic reprezintă o etapă importantă în însăși menținerea ozelor în celulă ca și în metabolizarea lor ulterioară. Printre esterii fosforici ai ozelor menționăm glucozo-6-fosfatul, fructozo-6-fosfatul, fructozo-1,6-bisfosfatul (se preferă, în ultimul timp, prefixul „bis” în loc de di-, pentru desemnarea diesterilor fosforici).



5. Formarea glicozidelor. Gruparea  $\text{—OH}$  semiacetalică poate forma oxigen-eteri cu alți compuși care conțin o grupare  $\text{—OH}$  (de ex. cu alcooli). Compușii formați sînt desemnați ca glicozide: glicozidele glucozei sînt glucozide, ale galactozei-galactozide etc. Glicozidele se pot prezenta fie sub forma anomerului  $\alpha$ , fie a celui  $\beta$ . Cele două forme anomere ale metilglucopiranozidului sînt:



metil- $\beta$ -D-glicopiranozid



metil- $\alpha$ -D-glicopiranozid

Dacă eterificarea se face cu gruparea  $\text{—OH}$  a altei oze se obțin oligo- și polizaharide (vezi mai departe). Reacția cu o componentă neglicidică, desemnată cu termenul general de aglicon, duce la oxigen-, azot-, sulf-glicozide. De exemplu, nucleozidele sînt, așa cum s-a arătat, N-glicozide în care componenta monozaharidică este D-ribo- sau D-dezoxiribofuranoză iar agliconul este o bază azotată.



Importante din punct de vedere medical sînt glicozidele cardiotonice care au ca aglicon compuși steroidici. Administrate în insuficiența cardiacă, glicozidele cardiotonice scad frecvența și crește intensitatea bătăilor inimii. Agliconii liberi (genine) nu numai că nu sînt înzeștrați cu valoare terapeutică, dar reprezintă chiar otrăvuri.

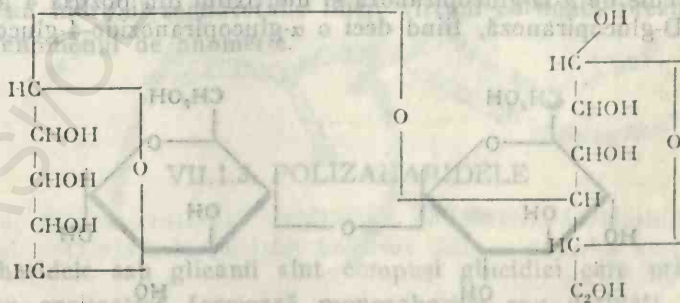
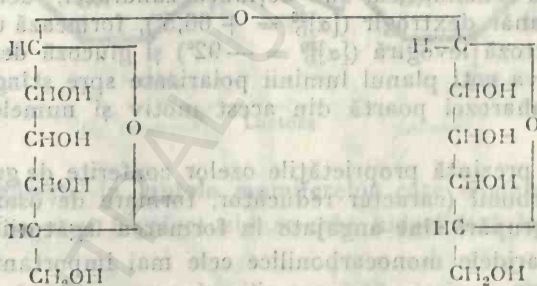
## VII.1.2. OLIGOZAHARIDELE

Oligozaharidele sînt compuși glucidici rezultați prin condensarea a două sau mai multor monozaharide (maximum 10). Legătura stabilită între monozaharide este de natură glicozidică.

Cele mai abundente și importante oligozaharide sînt dizaharidele. Dizaharidele rezultă formal prin condensarea a două molecule de monozaharid, care se poate face :

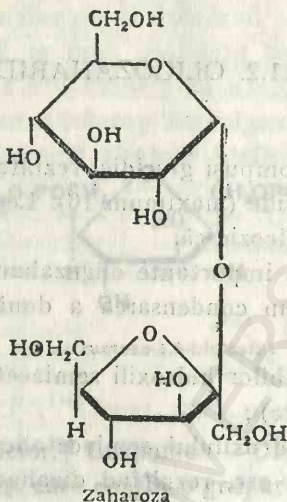
— cu participarea ambilor hidroxili semiacetalici, rezultînd dizaharide dicarbonilice (nereducătoare) ;

— cu participarea hidroxilului semiacetalic al unei oze și a unui hidroxil alcoolic al celeilalte oze, rezultînd dizaharide monocarbonilice (reducătoare).



Dintre zaharidele dicarbonilice cel mai important este zaharoza (suhroză), glucid foarte răspândit în regnul vegetal și anume în trestia de zahăr și în sfeclă, avînd o valoare nutritivă deosebită.

Zaharoza este constituită dintr-o moleculă de  $\alpha$ -glucopiranoză și una de  $\beta$ -fructofuranoză, legate 1—2, fiind deci un  $\alpha$ -glucopiranozido- $\beta$ -fructofuranozid :

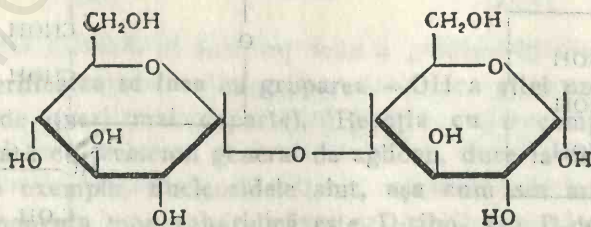


Prin hidroliză enzimatică, sub acțiunea zaharazei, denumită și invertază, zaharoza, zahăr dextrogir ( $[\alpha]_D^{20} = +66,5^\circ$ ), formează un amestec echi-molecular de fructoză levogiră ( $[\alpha]_D^{20} = -92^\circ$ ) și glucoză dextrogiră ( $[\alpha]_D^{20} = +52,5^\circ$ ), care va roti planul luminii polarizate spre stînga. Acest proces de hidroliză a zaharozei poartă din acest motiv și numele de invertire a zahărului.

Zaharoza nu prezintă proprietățile ozelor conferite de gruparea semiace-talică, virtual carbonil (caracter reducător, formare de osazone, anomerie), întrucît ambele grupări sînt angajate în formarea legăturii glicozidice.

Dintre dizaharidele monocarbonilice cele mai importante sînt maltoza, celobioza și lactoza.

Maltoza rezultă formal prin eliminarea apei între hidroxilul semiacetalic al unei molecule de  $\alpha$ -D-glucopiranoză și hidroxilul din poziția 4 a altei mo-lecule de  $\alpha$ -D-glucopiranoză, fiind deci o  $\alpha$ -glucopiranozido-4-glucopiranoză :

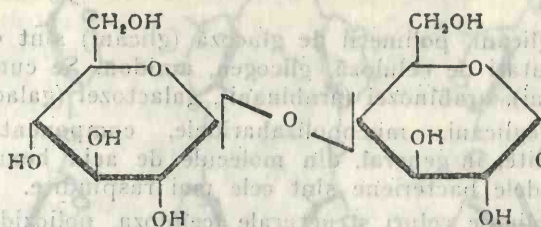


Maltoza



Maltoza ia naștere prin hidroliza enzimatică a amidonului și glicogenului.

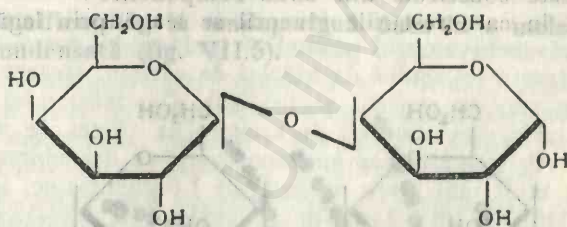
*Celobioza* este dizaharidul format din 2 molecule de  $\beta$ -glucopiranoză legate 1,4 fiind deci o  $\beta$ -glucopiranozido-4-glucopiranoză :



Celobioza

Celobioza ia naștere prin hidroliza celulozei.

*Lactoza* rezultă formal prin eliminarea unei molecule de apă între hidroxilul semiacetalic al  $\beta$ -D-galactopiranozei și hidroxilul din poziția 4 a unei molecule de  $\alpha$ -glucopiranoză, fiind deci o  $\beta$ -galactopiranozido-4-glucopiranoză :



Lactoza

Lactoza se găsește în laptele mamiferelor care o sintetizează din glucoză. Sub acțiunea unei  $\beta$ -galactozidaze este hidrolizată la zaharurile componente.

Dizaharidele de tip monocarbonilic prezintă, desigur, proprietățile ozelor date de gruparea carbonil (caracter reducător, formare de osazone). Întrucît dispun de un hidroxil semiacetalic liber, virtual carbonil, prezintă de asemenea și fenomenul de anomerie.

### VII.13. POLIZAHARIDELE

Polizaharidele sau glicanii sînt compuși glucidici care prin hidroliză chimică sau enzimatică formează monozaharide sau derivați ai acestora (glucozamină, galactozamină, acizi uronici, acid N-acetil-neuraminic).

Se disting :

- homoglicani — produși de policondensare a unui singur tip de unitate structurală ;
- heteroglicani — produși de policondensare a mai multor tipuri de unități structurale.

Dintre homoglicani, polimerii de glucoză (glicani) sînt cei mai răspîndiți, fiind reprezentați de celuloză, glicogen, amidon. Se cunosc și polimeri ai manozei (manani), arabinozei (arabinani), galactozei (galactozani) etc.

Dintre heteroglicani, mucopolizaharidele, componente ale proteoglicanilor (constituite, în general, din molecule de acid hexuronic și hexozamine) și poliozidele bacteriene sînt cele mai răspîndite.

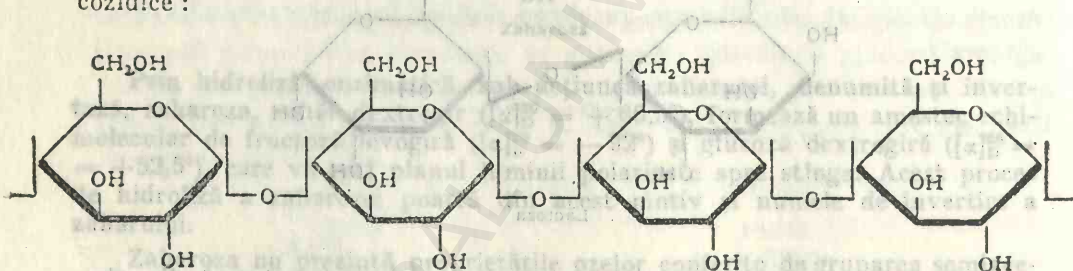
Glicanii îndeplinesc roluri structurale (celuloza, poliozidele prezente în peretele ectoplasmic al bacteriilor și în capsulă, mucopolizaharidele din țesutul conjunctiv) sau de depozitare a rezervelor energetice (amidonul, glicogenul).

În acest capitol se vor face referiri la structura amidonului și a glicogenului. Mucopolizaharidele vor fi descrise în capitolul „Proteoglicani”.

Amidonul este homoglicanul cel mai răspîndit în lumea vegetală, unde reprezintă rezerva glucidică principală.

Amidonul este constituit din două componente :

- amiloza, în care resturile glucozilor se leagă prin legături  $\alpha$ -(1,4)-glicozidice :



- amilopectina, în care resturile glicozilor se leagă nu numai prin legături  $\alpha$ -(1,4)-glicozidice, ci și prin legături  $\alpha$ -(1,6)-glicozidice, conferind moleculei o structură ramificată :



Masa moleculară a amilozei variază de la cîteva mii la jumătate de milion. Nu este solubilă în apă, formînd miceli hidratate care dau cu iodul o colorație albastră.

Amiloza formează structuri helicoidale, pasul helicei cuprinzînd 4—5 resturi glucozilor (fig. VII.4).



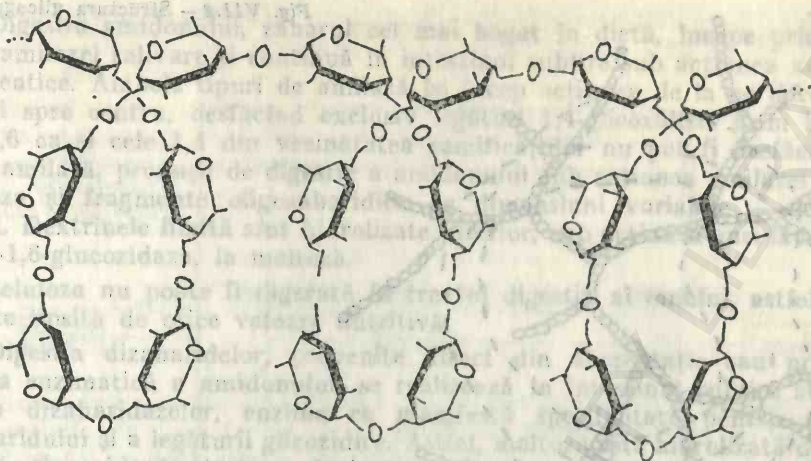


Fig. VII.4 — Structura elicoidală a amilozei.

Masa moleculară a amilopectinei este de ordinul zecilor sau sutelor de milioane. Nu este solubilă în apă, formînd soluții coloidale sau micelare care dau cu iodul o colorație roșie.

Prezența ramificațiilor în amilopectină duce la o moleculă de tip globular, foarte condensată (fig. VII.5).

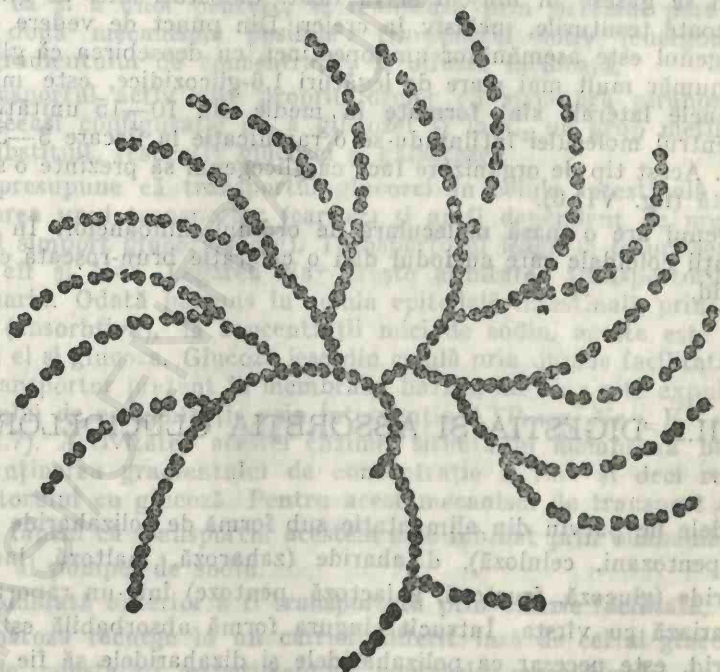
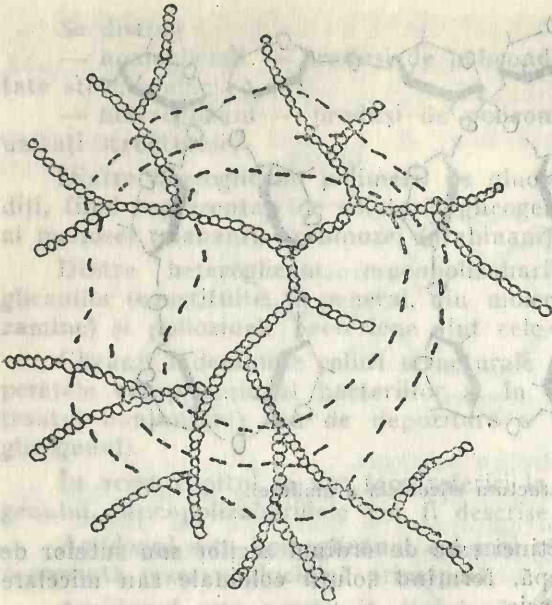


Fig. VII.5 — Structura amilopectinei.

Fig. VII.6 — Structura glicogenului



Glicogenul este echivalentul animal al amidonului vegetal, reprezentînd forma de depozitare a excesului de hidrați de carbon. Rezerve semnificative de glicogen se găsesc în mușchi și în ficat. Cantități mici de glicogen se găsesc în toate țesuturile, inclusiv în creier. Din punct de vedere al structurii, glicogenul este asemănător amilopectinei, cu deosebirea că glicogenul, avînd un număr mult mai mare de legături 1,6-glicozidice, este mai ramificat. Catenele laterale sînt formate în medie din 10—15 unități de glucoză, în centrul moleculei întîlnindu-se o ramificație la fiecare 3—5 unități de glucoză. Acest tip de organizare face ca glicogenul să prezinte o structură arborescentă (fig. VII.6).

Glicogenul are o masă moleculară de ordinul milioaneilor. În apă formează soluții coloidale care cu iodul dau o colorație brun-roșcată ce nu dispare la cald.

## VII.2. DIGESTIA ȘI ABSORBȚIA GLUCIDELOR

Glucidele ne parvin din alimentație sub formă de polizaharide (amidon, glicogen, pentozani, celuloză), dizaharide (zaharoză, maltoză, lactoză) și monozaharide (glucoză, fructoză, galactoză, pentoze) într-un raport procentual ce variază cu vîrsta. Întrucît singura formă absorbabilă este cea de monozaharid, este necesar ca polizaharidele și dizaharidele să fie mai întîi hidrolizate la monozaharidele componente în cursul procesului de digestie.



Digestia amidonului, zaharul cel mai bogat în dietă, începe prin acțiunea amilazei salivare și continuă în intestinul subțire sub acțiunea amilazei pancreatice. Ambele tipuri de amilază își încep acțiunea de la periferia moleculei spre centru, desfășurând exclusiv legături 1,4-glicozidice. Cum legăturile 1,6 ca și cele 1,4 din vecinătatea ramificațiilor nu pot fi desfăcute de către amilază, produșii de digestie a amidonului sub acțiunea amilazei vor fi maltoza și fragmente oligozaharidice de dimensiuni variabile — dextrine limită. Dextrinele limită sînt hidrolizate ulterior, sub acțiunea unei hidrolaze, amilo-1,6-glucozidaza, la maltoză.

Celuloza nu poate fi digerată în tractul digestiv al omului, astfel încît ea este lipsită de orice valoare nutritivă.

Digestia dizaharidelor, provenite direct din alimentație sau prin hidroliza enzimatică a amidonului, se realizează în intestinul subțire sub acțiunea dizaharidazelor, enzime ce manifestă specificitate pentru natura dizaharidului și a legăturii glicozidice. Astfel, maltoza este hidrolizată de maltază ( $\alpha$ -glucozidază), lactoza de lactază ( $\beta$ -galactozidază), zaharoza de zaharază ( $\alpha$ -glucozidază sau  $\beta$ -fructozidază). Toate aceste enzime sînt concentrate la nivelul jejunului și sînt sintetizate de către enterocite. Ele acționează la nivelul marginii în perie a enterocitului (și nu în lumenul intestinal), în vecinătatea sistemului de transport al monozaharidelor rezultate. De remarcat că membrana plasmatică a celulelor epiteliale intestinale (suprafața apicală) are o structură microvilară, ceea ce mărește substanțial suprafața activă în procesul de digestie și absorbție a zaharurilor.

Absorbția monozaharidelor, respectiv a glucozei, fructozei, galactozei, manozei ca și a unor pentoze, se realizează prin sistemul port hepatic și implică două mecanisme posibile: transportul activ (energodependent), contra gradientului de concentrație, și difuzia facilitată.

Transportul activ este propriu ozelor cu structură piranozică, avînd la  $C_2$  aceeași configurație cu a glucozei și la  $C_5$  un grup metil substituit sau nesubstituit, respectiv glucozei și galactozei.

Se presupune că transportul glucozei în celula intestinală se face cu participarea unui transportor (carrier) și ar fi dependent de prezența  $Na^+$  (sistemul simport glucoză-sodiu). Transportorul leagă la locuri separate atît glucoza cît și  $Na^+$ . Legarea  $Na^+$  crește afinitatea transportorului pentru monozaharid. Odată pătruns în celula epitelială intestinală prin membrana apicală (absorbțivă), la concentrații mici de sodiu, acesta este eliberat și odată cu el și glucoza. Glucoza iese din celulă prin difuzie facilitată, mediată de un transportor prezent în membrana bazală, iar  $Na^+$  este expulzat contra gradientului de concentrație prin intervenția ATP-azei  $Na^+$ ,  $K^+$  dependente (fig. VII.7). Activitatea acestei enzime, situată în membrana bazală, permite menținerea gradientului de concentrație a  $Na^+$  și deci reîncărcarea transportorului cu glucoză. Pentru acest mecanism de transport al glucozei pledează faptul că transportul acesteia este inhibat prin ouabaină, cunoscut inhibitor al pompei de sodiu.

Considerată anterior a fi transportată prin difuzie facilitată, s-ar părea că și fructoza recurge la un carrier, diferit însă de cel al glucozei.

Unele constatări experimentale contrazic mecanismele de absorbție propuse care nu par, în forma actuală, incontestabile.

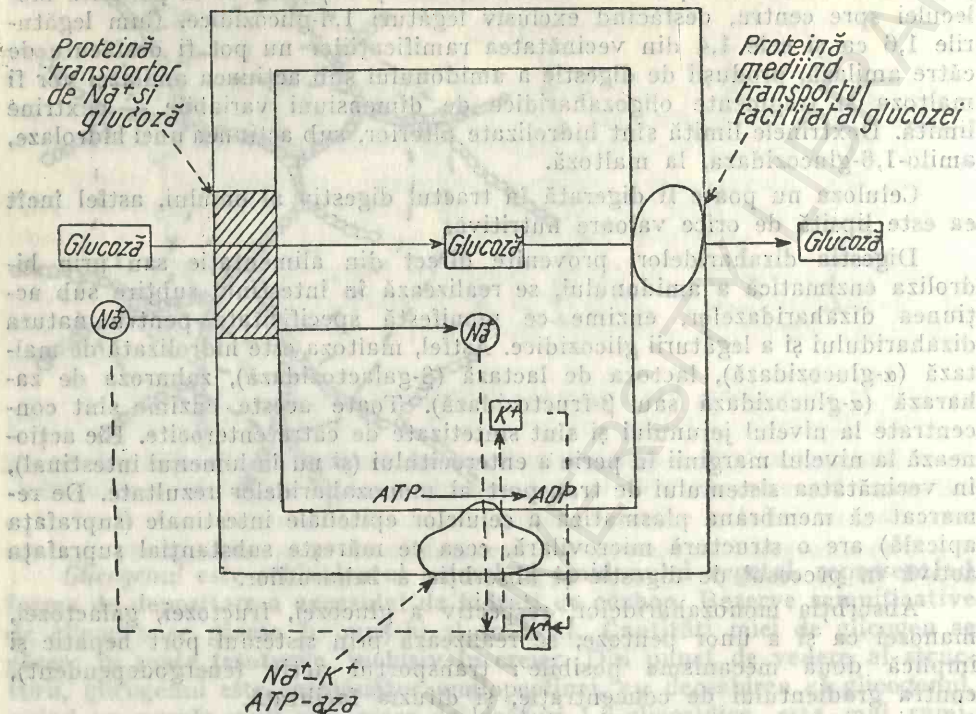


Fig. VII.7 — Transportul glucozei prin mucoasa intestinală.

## VII.2.1. DEFICITE ENZIMATICE ÎN DIGESTIA ȘI ABSORBȚIA GLUCIDELOR

Există anumite anomalii în digestia dizaharidelor, determinate de deficitul enzimatic al dizaharidazelor și care duc la intoleranță la dizaharide. Deficitul de lactază duce la intoleranță la lactoză, cel de zaharază la intoleranță la zaharoză. Semnele clinice ale intoleranței la dizaharide sînt comune și se exprimă prin dureri abdominale, diaree cronică, flatulență. Acumularea în intestin a dizaharidelor, compuși osmotici activi, crește presiunea osmotică și favorizează intrarea apei din spațiile interstițiale în lumenul intestinal ducînd la pierderi digestive de apă. Procesele fermentative declanșate de flora microbiană generează produși care irită mucoasa intestinală (de ex. acid lactic); în extremis, aceasta devine permeabilă la dizaharide, care se vor elimina prin urină.



- De menționat că deficiența de lactază poate fi moștenită, situație în care se manifestă imediat după naștere, sau se poate datora scăderii în timp a activității enzimatice.

Deficitul de dizaharidaze poate fi secundar unor boli ca enterite, colite, sprue. Se cunoaște și un deficit de trehalază, evidențiat strict după ingestia de ciuperci tinere (unica sursă de trehaloză).

### VII.3. CĂILE DE METABOLIZARE A GLUCOZEI

Glucosa îndeplinește în organism roluri metabolice multiple care o fac indispensabilă. Pe lângă faptul că reprezintă un combustibil excelent pentru țesuturi (quasi-exclusiv pentru țesuturile glucodependente), glucosa mai este necesară pentru furnizarea unor compuși importanți cum ar fi:

- pentoze — necesare sintezei nucleotidelor și acizilor nucleici;
- acizi uronici — necesari sintezei de proteoglicani și proceselor de detoxifiere a unor compuși endogeni sau exogeni;
- glicerol și acetil-CoA necesare procesului de neolipogeneză;
- NADPH — necesar biosintezelor reductive;
- aminoacizi neesențiali și produși specializați derivați din aceștia (purine, pirimidine, porfirine).

Utilizarea glucozei drept sursă de energie necesită parcurgerea glicolizei (degradare incompletă, până la piruvat) și a ciclului Krebs (degradare completă, până la  $\text{CO}_2$ ).

Prin parcurgerea glicolizei se obțin de asemenea elementul de construcție a acizilor grași (acetil-CoA) și glicerolul.

Pentoze și NADPH se obțin în cursul desfășurării căii 6-fosfogluconat, iar acizi uronici în așa-zisa cale a glucuronatului.

Sinteza de aminoacizi se realizează prin furnizarea de către glucoză a scheletului hidrocarbonat al acestora ( $\alpha$  cetoacizii rezultați în ciclul Krebs).

Angajarea glucozei în una sau alta dintre căile metabolice posibile va fi decisă de starea metabolică a țesutului respectiv. În faza anabolică, caracterizată prin abundență de substrate energogene, rezultat al absorbției postprandiale, glucosa va fi transformată în piruvat și apoi oxidată terminal în ciclul Krebs în vederea asigurării resurselor energetice ale organismului. Utilizarea glucozei drept combustibil energogen este „permisă” în fază anabolică oricărui țesut, atât celor glucodependente, cât și celor glucoindependente (insulinodependente).

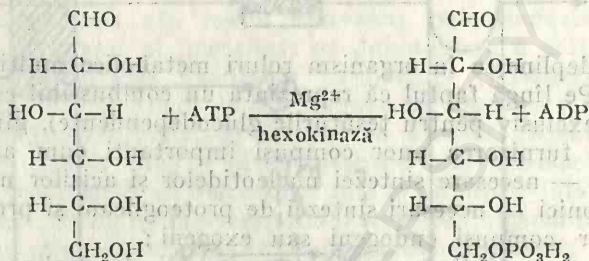
Cu precădere în ficat, glicoliza se poate desfășura exclusiv în vederea obținerii elementelor de construcție a trigliceridelor, care vor fi depozitate în țesutul adipos. Transformarea glucozei în triacil gliceroli, fosfolipide și colesterol are loc atunci când posibilitățile ficatului de a stoca glucoză sub formă de glicogen au fost depășite.

În faza catabolică — în perioade interprandiale sau în cursul unei hiperactivități fizice sau intelectuale — glucosa nu mai reprezintă combustibilul

principal decât pentru țesuturile glucodependente, care o obțin prin glicogenoliză și gluconeogeneză hepatică. Surse de energie pentru celelalte țesuturi devin rezervele de lipide constituite în faza anabolică și, în extremis, proteinele.

Metabolizarea glucozei prin oricare dintre căile enumerate este precedată cu obligativitate de fosforilare, condiție necesară răminerii ei în celulă. Într-adevăr, gruparea fosfat, puternic ionizată la pH fiziologic, conferă moleculei de glucozo-6-fosfat o încărcare netă negativă și șanse minime de a străbate membrana celulară.

Fosforilarea glucozei, în prezența ATP ca donator de grupare fosfat, este o reacție ireversibilă catalizată de hexokinază:



Hexokinazele diverselor țesuturi sînt enzime alosterice ce se prezintă sub forma mai multor specii moleculare. Ele sînt inhibitate alosteric de glucozo-6-fosfat. Dacă necesitățile celulei la un moment dat impun inhibarea uneia dintre căile de metabolizare a glucozei, acumularea temporară de glucozo-6-fosfat în celulă va opri fosforilarea glucozei pînă ce aceasta va fi consumată. Hexokinazele din ficat și țesutul adipos sînt de asemenea inhibitate de acizii grași. Scăderea captării glucozei în condițiile unei concentrații intracelulare mari de acizi grași poate fi explicată prin prisma acestei constatări.

În ficat, pe lângă fosforilarea prin hexokinază (distribuită ubicuitar), fosforilarea glucozei poate avea loc și sub acțiunea glucokinazei. Spre deosebire de hexokinază, care poate utiliza drept substrat și alte hexoze, glucokinaza utilizează exclusiv glucoza. Deosebirea fundamentală între cele două kinaze o constituie însă diferența valorilor  $K_M$  pentru glucoză. În timp ce hexokinazele au un  $K_M$  mic, deci afinitate mare pentru glucoză, glucokinaza are un  $K_M$  mare. Valorile mici ale  $K_M$  permit hexokinazelor să asigure necesarul de glucoză pentru țesuturi chiar la concentrații mici ale acesteia în sânge, ceea ce este esențial pentru țesuturile glucodependente. Glucokinaza hepatică este activă numai în condițiile unui aport masiv de glucoză (valori peste 100 mg/dl ale glicemiei), care, depășind nevoile de moment ale organismului, va fi depusă, după conversia la glucozo-6-fosfat, ca glicogen. La concentrații mari de glucoză (de ex. postprandial), hexokinaza hepatică ar fi incapabilă să asigure fosforilarea glucozei în ritmul impus de necesitățile restabilirii glicemiei.

Prezența celor două enzime în ficat asigură acestuia un rol central în reglarea captării glucozei și menținerea glicemiei. Scăderea sintezei glucokinazei în diabet justifică perturbarea depunerii de glicogen în aceste condiții și este responsabilă în parte de creșterea glicemiei.



### VII.3.1. GLICOLIZA (SECVENȚA EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS)

Funcția majoră a glucozei în organism este aceea de a servi drept sursă de energie metabolică. Eliberarea energiei încorporate în molecula de glucoză se realizează fie parțial, prin degradarea sa la piruvat, fie total, prin oxidare la  $\text{CO}_2$ .

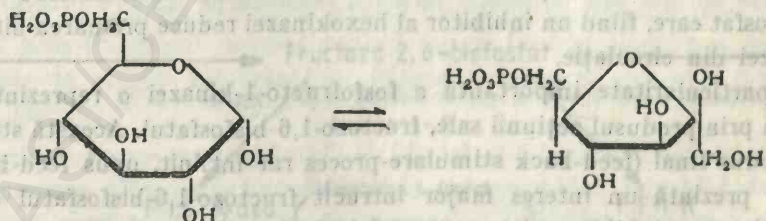
Oxidarea glucozei pînă la piruvat se realizează prin parcurgerea glicolizei — cale metabolică elucidată de către Embden, Meyerhof și Parnas. Piruvatul rezultat în glicoliză este oxidat în continuare pînă la  $\text{CO}_2$  prin parcurgerea ciclului Krebs, în condițiile în care țesuturile dispun de oxigen, sau este redus la lactat, în condițiile în care aportul de oxigen este scăzut.

Desfășurarea glicolizei, proces puternic exergonic ( $\Delta G^\circ = -47 \text{ Kcal}$ ), se realizează în scopul procurării ATP. În condițiile unei disponibilități crescute de glucoză (postprandial) toate țesuturile, inclusiv cele insulino-dependente (țesutul adipos, mușchiul), vor utiliza glucoza în vederea obținerii resurselor energetice.

În ficat, spre deosebire de alte organe, glicoliza reprezintă și modalitatea metabolică de transformare a glucozei, oferită în cantități mari postprandial, în lipide de rezervă, respectiv trigliceride, formă ideală de depozitare a energiei, la care se va face apel în condițiile în care concentrația glucozei în sânge este redusă. Glicoliza furnizează atît componenta glicerol a trigliceridelor cît și elementul de construcție a acizilor grași care este acetil  $\sim \text{CoA}$  (vezi metabolismul lipidelor). De menționat că ficatul utilizează componenta glicerol (ca glicerolfosfat) și în vederea obținerii fosfolipidelor, iar componenta acetil  $\sim \text{CoA}$  și în scopul sintezei colesterolului. Acești compuși de natură lipidică vor fi exportati țesuturilor extrahepatice (cu precădere țesutului adipos), sub formă de lipoproteine.

Secvența glicolică se desfășoară în citozol și presupune următoarele transformări enzimatice catalizate:

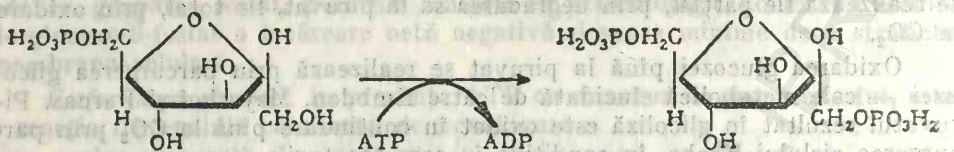
1. Conversia glucozo-6-fosfatului la fructozo-6-fosfat. Izomerizarea  $\alpha$ -glucopiranozo-6-fosfatului la  $\beta$ -fructofuranozo-6-fosfat se realizează, sub acțiunea glucozo-6-fosfat izomerazei. Enzima realizează izomerizarea celor două oze într-o reacție reversibilă ce necesită prezența ionilor de  $\text{Mg}^{2+}$  sau  $\text{Mn}^{2+}$ :



\* Forma animerică preferată de enzimele glicolizei (ca și de cele ale șantului pentozelor este forma  $\beta$ , așa cum atestă studii recente de cinetică enzimatică și RMN.

## 2. Fosforilarea fructozo-6-fosfatului (F-6-P)

Fosforilarea  $\beta$  fructofuranozo-6-fosfatului la  $\beta$ -fructofuranozo-1,6-bis-fosfat (F-1,6-P<sub>2</sub>) se realizează într-o reacție ireversibilă ( $\Delta G^\circ = -3,4$  Kcal) catalizată de fosfofructo-1-kinază (FF-1-K):



Dintre toate enzimele implicate în glicoliză, fosfofructo-1-kinaza este, atît în ficat cît și în rinichi, enzima cu activitatea cea mai redusă. Amplaarea degradării hexozomonofosfaților depinde, în aceste țesuturi de viteza conversiei fructozo-6-fosfat  $\rightarrow$  fructozo-1,6-bisfosfat, care este deci etapa limitantă de viteză în glicoliză.

Fosfofructo-1-kinaza este o enzimă alosterică a cărei activitate este controlată de numeroși efectori metabolici, pozitivi sau negativi. Astfel, fosfofructo-1-kinaza este sensibilă la variațiile stării energetice a celulei, ATP comportîndu-se ca inhibitor alosteric. Concentrațiile mari de ATP intracelular inhibă activitatea enzimei prin legare la un loc (situs) alosteric, diferit de locul activ ce leagă ATP ca substrat. De menționat că AMP și ADP se comportă ca efectori pozitivi, suprimînd inhibiția prin ATP. Se înțelege că activitatea fosfofructo-1-kinazei va crește ori de cîte ori concentrația de ATP intracelular este redusă, iar cea de ADP crescută. Enzima este inhibată și de fosfoenolpiruvat și 1,3-bisfosfoglicerat, intermediari macroergici ai glicolizei, inhibiție ce reflectă de asemenea dependența fluxului glicolitic de încărcarea energetică a celulei.

Un inhibitor puternic al enzimei s-a dovedit a fi citratul, care accentuează inhibiția prin ATP, scăzînd în același timp afinitatea enzimei pentru fructozo-6-fosfat, substratul său. Cum citratul este un intermediar al ciclului Krebs de degradare aerobă a metabolitelor, inhibiția fosfofructo-1-kinazei prin citrat ar putea fi invocată în explicarea inhibiției glicolizei prin respirație (efectul Pasteur). Inhibiția prin citrat are în ficat și o altă semnificație. Citratul obținut din glucoză este precursorul imediat al acetil~CoA pe seama căreia se va realiza neolipogeneza hepatică. Inhibiția fosfofructo-1-kinazei prin acumulare de citrat suprimă utilizarea glucozei în neolipogeneză ca și arderea sa în ciclul Krebs. Inhibiția fosfofructo-1-kinazei duce la acumulare de glucozo-6-fosfat care, fiind un inhibitor al hexokinazei reduce preluarea ulterioară a glucozei din circulație.

O particularitate importantă a fosfofructo-1-kinazei o reprezintă activarea sa prin produsul acțiunii sale, fructozo-1,6-bisfosfatul. Această stimulare prin produs final (feed-back stimulare-proces rar întîlnit, opus feed-back inhibiției) prezintă un interes major întrucît fructozo-1,6-bisfosfatul este în același timp un inhibitor al fructozo-1,6-bisfosfatazei, enzimă ce catalizează reacția inversă, de formare a fructozo-6-fosfatului din fructozo-1,6-bisfosfat. Cum aceste două enzime reprezintă puncte cheie în controlul glicolizei și glu-



coneogenezei — căi antagoniste ce nu trebuie să se desfășoare simultan la viteze comparabile — se poate imagina importanța reglatoare a fenomenului descris (vezi reglarea gluconeogenezei).

Efectorul alosteric pozitiv cel mai eficient al fosfofructo-1-kinazei s-a demonstrat recent a fi fructozo-2,6-bisfosfat. Această moleculă cu rol de semnal, de integrator metabolic, este sintetizată și degradată de către o enzimă bifuncțională: fosfofructo-2-kinaza/fructozo-2,6-bisfosfataza (FF-2-K/F-2,6 P<sub>2</sub>-aza). Enzima, izolată și secvențializată, cuprinde 470 de amonoacizi care pot fi divizați în două domenii: domeniul kinazic, amino-terminal (reziduurile 1—249) și domeniul fosfatazic — carboxi-terminal (reziduurile 250—470). Enzima este reglată covalent, prin interconversie fosfo-defosfo. Prin fosforilare sub acțiunea proteinkinazei-A (AMP<sub>c</sub> dependentă), activitatea kinazică scade în timp ce activitatea fosfatazică crește.

Concentrația hepatică de fructozo-2,6-bisfosfat este controlată de doi efectori majori și anume de fructozo-6-fosfat și AMP<sub>c</sub>:

— fructozo-6-fosfat crește concentrația de fructozo-2,6-bisfosfat prin activarea alosterică a fosfofructo-2-kinazei și inhibiția fructozo-2,6-bisfosfatazei;

— AMP<sub>c</sub> scade concentrația de fructozo-2,6-bisfosfat, inactivând, via protein kinaza-AMP<sub>c</sub> dependentă, fosfofructo-2-kinaza (inactivă în formă fosfo) și activând simultan fructozo-2,6-bisfosfataza (activă în formă fosfo) (fig. VII.8).

Dependența concentrației de fructozo-2,6-bisfosfat de AMP<sub>c</sub> face fosfofructo-1-kinaza susceptibilă la control hormonal și explică, cel puțin parțial, efectul glucagonului și insulinei asupra glicolizei, gluconeogenezei și lipogenezei.

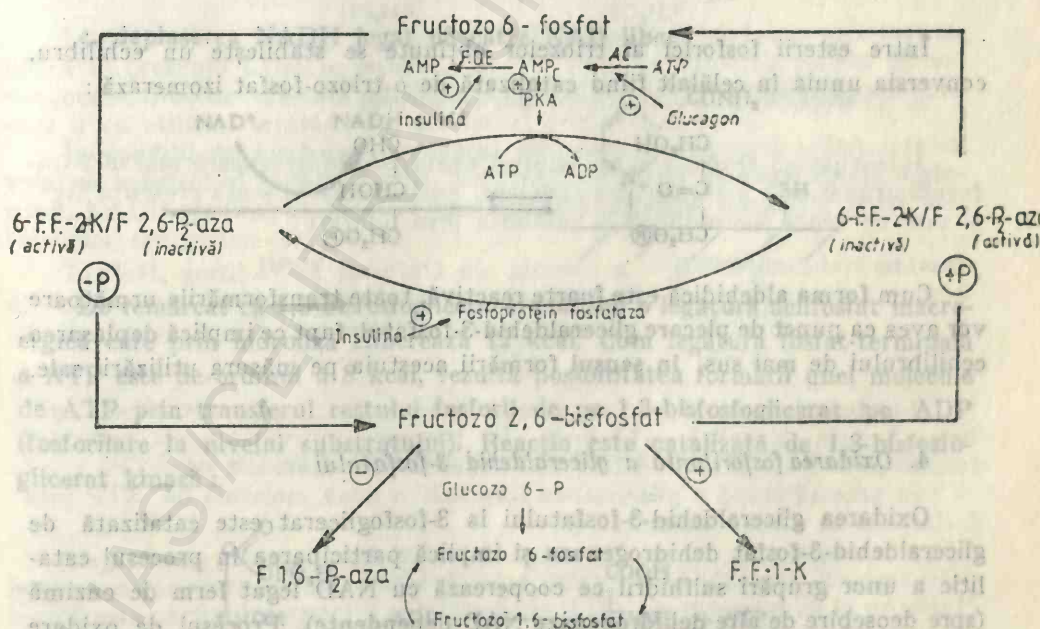
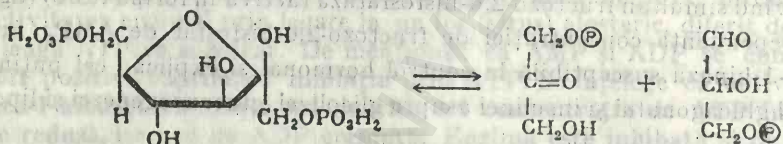


Fig. VII.8 — Reglarea concentrației fructozo-2,6-bisfosfatului în hepatocit.

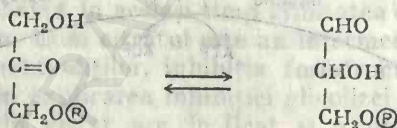
Scăzând concentrația fructozo-2,6-bisfosfatului, activator al fosfofructo-1 kinazei și inhibitor al fructozo-1,6-bisfosfatazei, glucagonul inhibă glicoliza și lipogeneza și activează gluconeogeneza. Dependența concentrației de fructozo-2,6-bisfosfat de factori nutriționali (concentrația de fructozo-6-fosfat, respectiv de glucozo-6-fosfat) și hormonal (prezența sau absența glucagonului) face ca fructozo-2,6-bisfosfatul să fie considerat semnal de abundență glucidică, în contrast cu AMP, considerat semnal de absență a glucozei (hunger signal) (fig. VII.8). Fructozo-2,6-bisfosfatul va decide fluxul de substrate fie spre glicoliză fie spre gluconeogeneza. De menționat că acțiunea unor factori mitogeni, oncogeni și promotori tumorali asupra glicolizei s-ar realiza prin controlul activității FF-2-K/F,2,6P<sub>2</sub>-aza.

### 3. Scindarea fructozo-1,6-bisfosfatului

Fructozo-1,6-bisfosfatul este scindat la două trioze, și anume, gliceraldehid-3-fosfat și dihidroxiaceton-fosfat, într-o reacție reversibilă catalizată de o liază, fructozo-1,6-bisfosfatliaza sau aldolaza:



Între esterii fosforici ai triozelor obținute se stabilește un echilibru, conversia unuia în celălalt fiind catalizată de o triozo-fosfat izomerază:



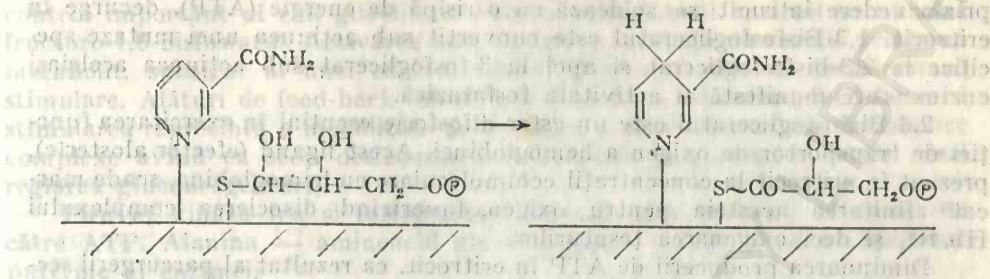
Cum forma aldehidică este foarte reactivă, toate transformările următoare vor avea ca punct de plecare gliceraldehid-3-fosfatul, fapt ce implică deplasarea echilibrului de mai sus, în sensul formării acestuia pe măsura utilizării sale.

### 4. Oxidarea fosforilantă a gliceraldehid 3-fosfatului

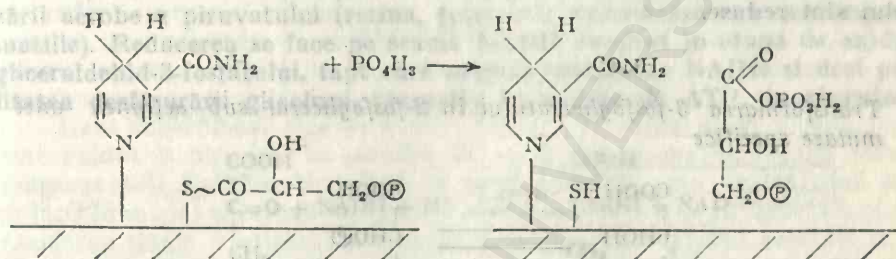
Oxidarea gliceraldehid-3-fosfatului la 3-fosfoglicerat este catalizată de gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza și implică participarea în procesul catalitic a unor grupări sulfhidril ce cooperează cu NAD legat ferm de enzimă (spre deosebire de alte dehidrogenaze NAD dependente). Procesul de oxidare presupune următoarele etape:



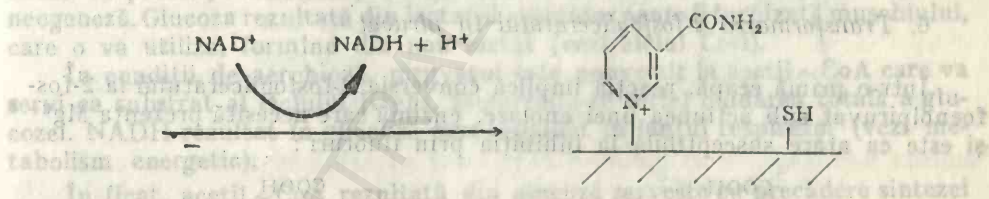
a. adăția unei grupări -SH din centrul activ al enzimei la glicerăldéhid-3-fosfat, cu formarea unui semitioacetal (analog semiacetalilor) și oxidarea semitioacetalului pe seama NAD légat, cu formarea unui tioester :



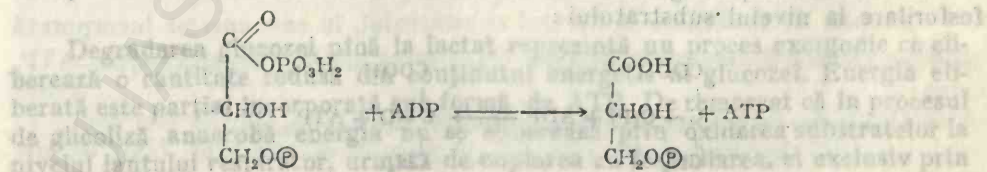
b. fosforoliza tioesterului cu formarea 1,3-bisfosfogliceratului și eliberarea grupării -SH a enzimei :



c. deplasarea NADH légat de către NAD léber :



De remărcat că 1,3-bisfosfogliceratul conține o legătură acilfosfat macro-ergică care prin hidroliză eliberează 12 kcal. Cum legătura fosfat-terminală a ATP este de ordinul a 8 kcal, rezultă posibilitatea formării unei molecule de ATP prin transferul restului fosforil de pe 1,3-bisfosfoglicerat pe ADP (fosforilare la nivelul substratului). Reacția este catalizată de 1,3-bisfosfoglicerat kinază :



Desfășurarea etapei: gliceraldehid-3-fosfat +  $P_i$  + ADP + NAD  $\rightarrow$  3-fosfoglicerat + ATP + NADH +  $H^+$  implică necesitatea reoxidării permanente a NADH rezultat în cursul glicolizei ce se desfășoară în citozol.

O deviere a 1,3-bisfosfogliceratului din calea glicolică, paradoxală la prima vedere întrucît se soldează cu o risipă de energie (ATP), decurge în eritrocit. 1,3-Bisfosfogliceratul este convertit sub acțiunea unei mutaze specifice la 2,3-bisfosfoglicerat și apoi la 3-fosfoglicerat sub acțiunea aceleiași enzime care manifestă și activitate fosfatazică.

2,3-Bisfosfogliceratul este un ester difosforic esențial în exercitarea funcției de transportor de oxigen a hemoglobinei. Acest ligand (efector alosteric), prezent în eritrocit la concentrații echimoleculare cu hemoglobina, scade marcat afinitatea acesteia pentru oxigen, favorizînd disocierea complexului Hb. $4O_2$  și deci oxigenarea țesuturilor.

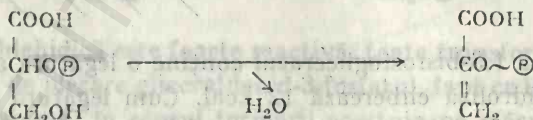
Diminuarea producerii de ATP în eritrocit, ca rezultat al parcurgerii secvenței 1,3-bisfosfoglicerat  $\rightarrow$  2,3-bisfosfoglicerat  $\rightarrow$  3-fosfoglicerat, face posibilă desfășurarea glicolizei și implicit menținerea unei concentrații optime de 2,3-bisfosfoglicerat, chiar în condițiile în care necesitățile de ATP ale eritrocitului sînt reduse.

### 5. Transformarea 3-fosfogliceratului în 2-fosfoglicerat sub acțiunea unei mutaze specifice



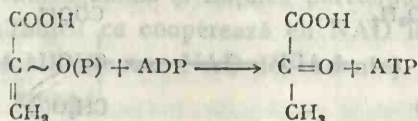
### 6. Transformarea 2-fosfogliceratului în piruvat

Într-o primă etapă, reacția implică conversia 2-fosfogliceratului la 2-fosfoenolpiruvat sub acțiunea unei enolaze, enzimă care necesită prezența  $Mg^{2+}$  și este ca atare susceptibilă la inhibiția prin fluoruri:



2-fosfoenolpiruvatul este un compus macroergic; legătura enolfosfat eliberează prin hidroliză  $\sim 14$  kcal. În prezența piruvat kinazei, radicalul fosforil este transferat pe ADP, cu formarea unei molecule de ATP.

În această etapă a glicolizei se formează o nouă moleculă de ATP prin fosforilare la nivelul substratului:

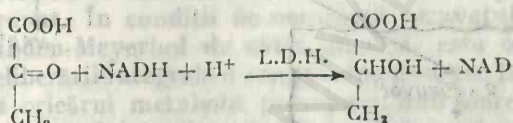




Piruvat kinaza se prezintă sub forma a două izoenzyme, de tip L, proprie ficatului, și de tip M, proprie mușchiului. Izoenzimele de tip L sînt enzime alosterice, tetrameri, susceptibile la acțiunea a numeroși efectori metabolici; etapa catalizată de piruvat kinază reprezintă din acest motiv un punct de control important al căii glicolitice. Printre stimulatorii enzimei se numără fructozo-1,6-bisfosfatul. Activarea unei căi într-o secvență de reacții printr-un metabolit, substrat al unei căi anterioare, poartă numele de feed-forward stimulare. Alături de feed-back inhibiție și feed-back stimulare, feed forward stimularea reprezintă o modalitate de realizare a unor interacțiuni metabolice complexe avînd ca scop desfășurarea armonioasă a proceselor vitale (vezi reglarea gluconeogenezei).

Piruvat kinaza (ca și fosfofructo-1-kinaza) este inhibată alosteric de către ATP. Alanina — aminoacid glucoformator — este și ea un inhibitor puternic al enzimei.

Piruvatul rezultat prin parcurgerea căii Embden-Meyerhof poate fi redus la lactat în condiții de relativă anaerobioză (ca în mușchiul în contracție) sau în țesuturi care nu dispun de echipamentul enzimatic necesar metabolizării aerobe a piruvatului (retina, țesuturile embrionare sau neoplazice, hematiele). Reducerea se face pe seama NADH rezultat în etapa de oxidare a gliceraldehid-3-fosfatului, fapt care asigură reoxidarea NADH și deci posibilitatea desfășurării glicolizei, respectiv furnizarea de ATP, în absența  $O_2$ :



Lactatul este „trimis“ pe cale sanguină ficatului și rinichiului care-l reoxidează în prezența LDH la piruvat, care va servi ca substrat pentru gluconeogeneză. Glucoza rezultată din lactatul muscular poate fi furnizată mușchiului, care o va utiliza, formînd din nou lactat (vezi ciclul Cori).

În condiții de aerobioză, piruvatul este convertit la acetil~CoA care va servi ca substrat al ciclului Krebs, asigurîndu-se astfel oxidarea totală a glucozei. NADH rezultat în glicoliză este reoxidat în lanțul respirator (vezi metabolism energetic).

În ficat, acetil~CoA rezultată din glucoză servește cu precădere sintezei de lipide în cadrul procesului de neolipogeneză.

În figura VII.9 este redată schema generală a glicolizei.

### VII.3.1.1. Bilanțul energetic al glicolizei

Degradarea glucozei pînă la lactat reprezintă un proces exergonic ce eliberează o cantitate redusă din conținutul energetic al glucozei. Energia eliberată este parțial incorporată sub formă de ATP. De remarcă că în procesul de glicoliză anaerobă energia nu se eliberează prin oxidarea substratelor la nivelul lanțului respirator, urmată de cuplarea cu fosforilarea, ci exclusiv prin

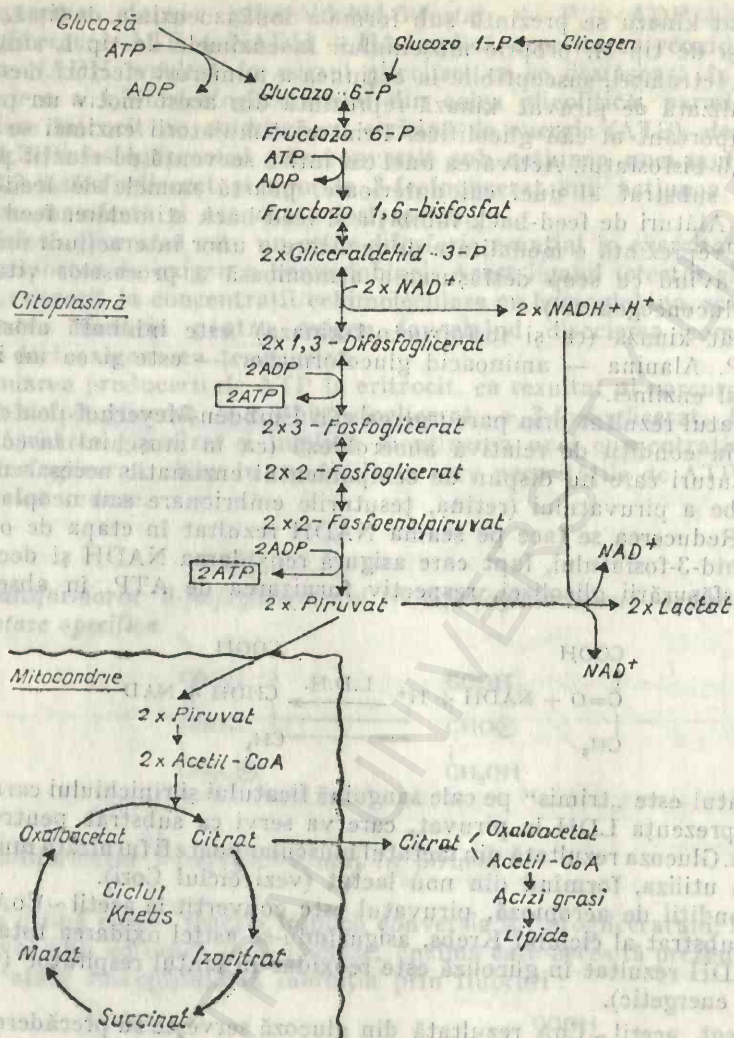


Fig. VII. 9 — Glicoliza.

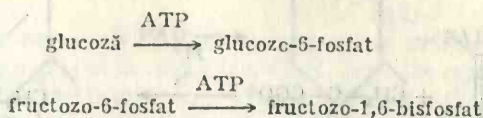
fosforilare la nivelul substratului. În aceste condiții glicoliza își asigură „pe cont propriu” reoxidarea echivalenților reducători, întrucât NADH rezultat în etapa gliceraldehid-fosfat dehidrogenază este reoxidat la NAD în cursul reacției de trecere a piruvatului în lactat.

Etapele de fosforilare la nivelul substratului, în care energia încorporată într-un substrat macroergic este transferată ADP, cu formarea ATP, sînt:

- conversia 1,3-bisfosfogliceratului la 3-fosfoglicerat;
- conversia fosfoenolpiruvatului la piruvat.



Întrucît dintr-o moleculă de glucoză rezultă două molecule de trioze, cantitatea de ATP formată este de 4 moli ATP per mol glucoză. Cîştigul energetic net este însă de numai 2 moli ATP dacă degradarea porneşte de la glucoză, întrucît reacţiile catalizate de kinaze şi anume :



consumă 2 moli ATP. Dacă degradarea porneşte de la glicogen cîştigul net este de 3 moli ATP întrucît glucozo-6-fosfatul se obţine prin fosforoliza glicogenului, neconsumatoare de ATP. Considerînd că energia eliberată la hidroliza legăturii fosfat terminale din ATP este de 7,3 kcal, cantitatea de energie eliberată în cursul glicolizei este de  $7,3 \times 2 = 14,6$  kcal/mol glucoză, respectiv  $7,3 \times 3 = 21,9$  kcal/mol glucoză. Cantitatea de energie eliberată este relativ mică, astfel încît glicoliza anaerobă pare neavantajoasă din punct de vedere energetic. Viteza foarte mare a fluxului glicolitic permite însă furnizarea unei cantităţi de energie care să satisfacă, cel puţin pentru perioade relativ scurte, necesităţile energetice ale ţesuturilor în absenţa oxigenului. Consumul crescut de glucoză face totuşi din glicoliză o cale neeconomică.

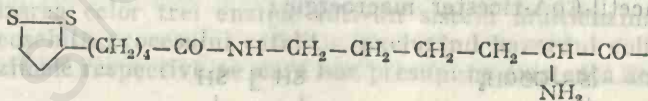
Dacă anaerobioza este de scurtă durată şi în sistem apare oxigen, lactatul este oxidat la piruvat. În condiţii de aerobioză piruvatul, format prin parcurgerea căii Embden-Meyerhof de către glucoză, este oxidat pînă la  $\text{CO}_2$  şi  $\text{H}_2\text{O}$  în scopul eliberării integrale a energiei încorporate în molecula glucozei. Oxidarea finală a oricărui metabolit presupune antrenarea acestuia în ciclul Krebs. Admisia piruvatului în ciclul Krebs implică conversia la acetyl-CoA şi se realizează prin decarboxilarea sa oxidativă.

### VII.3.2. DECARBOXILAREA OXIDATIVĂ A PIRUVATULUI

Este un proces complex ce presupune colaborarea următoarelor enzime şi cofactori :

— piruvat dehidrogenaza (decarboxilantă), avînd ca grupare prostetică tiamin pirofosfatul (TPP) ;

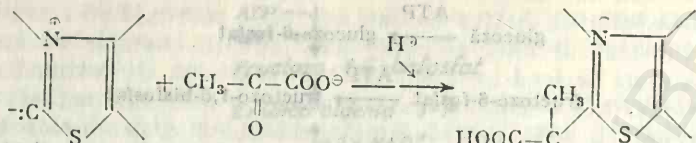
— lipoil reductaz transacetilaza, avînd ca gruparea prostetică acidul lipoic. De menţionat că acidul lipoic se leagă la enzimă prin gruparea  $\epsilon$ -amine a unei molecule de lizină :



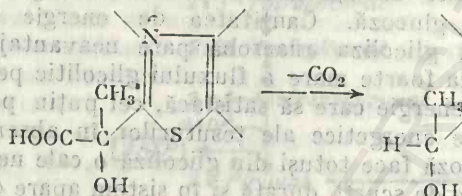
— lipoat dehidrogenaza, avînd ca grupare prostetică FAD, CoASH şi NAD.

Cele trei enzime alcătuiesc un sistem multienzimatic cu un aranjament spaţial rigid, care poartă numele de sistemul piruvat dehidrogenază.

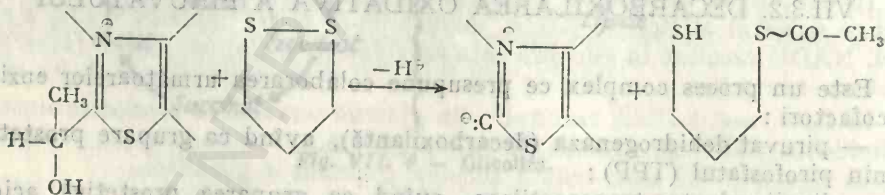
Decarboxilarea piruvatului necesită adăugarea TPP la piruvat — adăugare efectuată ca urmare a unui atac nucleofil realizat de ionul ilidă, formă ionizată a nucleului tiazolic al TPP, asupra carbonului carbonilic pozitivat din molecula piruvatului :



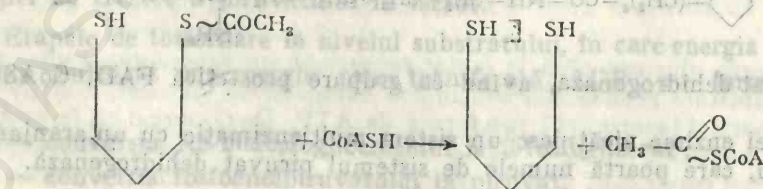
Compusul de adăugare se decarboxilează cu formarea acetaldehidei active :



Urmează etapa de oxidare propriu-zisă, constind în pierderea hidrogenului și transformarea acetaldehidei în radical acetyl. Reacția este catalizată de o dehidrogenază, una dintre cele trei enzime ale sistemului multienzimatic și anume piruvat dehidrogenaza. Cum reacția se desfășoară în prezența acidului lipoic, se formează acid acetyl-lipoic. De remarcat este faptul că energia eliberată prin oxidare se regăsește în tioesterii care se formează (acetyl ~ lipoic și apoi acetyl ~ CoA).

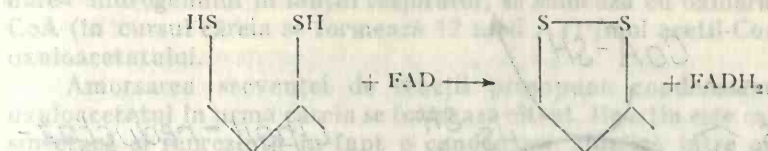


Radicalul acetyl, temporar legat la acidul lipoic, este transferat coenzimei A cu formarea acetyl-CoA-tioester macroergic :



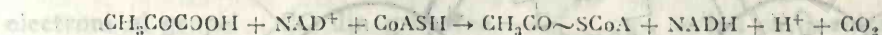


Acidul lipoic astfel redus se reoxidează în prezența lipoat dehidrogenazei, flavin enzimă ce transferă hidrogenul acidului lipoic pe FAD.



Atomii de hidrogen din FADH<sub>2</sub> sint apoi transferați pe NAD<sup>+</sup>.

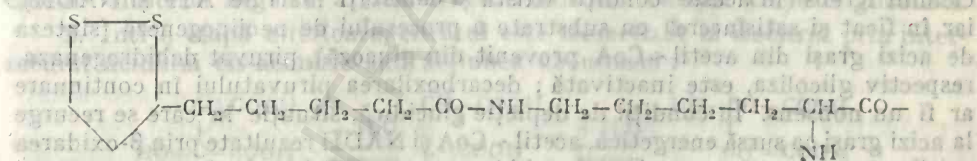
Reacția globală a decarboxilării oxidative a piruvatului:



este o reacție ireversibilă avind un  $\Delta G^\circ$  foarte negativ ( $-8$  kcal). Ireversibilitatea acestei reacții constituie motivul pentru care acizii grași cu număr par de atomi de carbon sau diverși aminoacizi ce formează prin degradare acetil~CoA nu sint glucoformatori.

De menționat că în avitaminoza B<sub>1</sub> decarboxilarea oxidativă a piruvatului nu se poate realiza prin lipsa TPP, ceea ce are grave repercusiuni asupra creierului, care se află în situația de a nu putea folosi aerob-glucoza. Deficitul sistemului piruvat dehidrogenazic este responsabil de fenomenele nervoase ce caracterizează avitaminoza B<sub>1</sub>.

Enzimele implicate în decarboxilarea oxidativă a piruvatului, și anume: piruvat dehidrogenază, lipoil reductaz transacetilază și lipoatdehidrogenază, alcătuiesc, așa cum s-a arătat, un sistem multienzimatic cu o determinare spațială rigidă. Pe „miezul“ sistemului, reprezentat de lipoil reductaz transacetilază, sint ancorate celelalte două enzime. Transformarea substratelor presupune ca acestea să fie purtate succesiv la enzimele sistemului. Într-adevăr, operațiunea este realizată de către acidul lipoic legat la radicalul lizil din molecula lipoil reductaz transacetilazei care astfel realizează un „braț“ flexibil de aproximativ 1,4 nm:



Acest „braț“ încărcat efectuează o mișcare de „du-te vino“ între grupările prostetice ale sistemului multienzimatic în cursul căreia fiecare enzimă își realizează acțiunea, produsul unei reacții enzimatic catalizate, devenind substrat pentru următoarea enzimă (fig. VII.10).

Organizarea celor trei enzime într-un sistem multienzimatic conferă o eficiență deosebită procesului catalitic, excluzind hazardul coliziunii substratelor cu enzimele respective pe care l-ar presupune existența acestora în stare liberă.

Cercetări recente au evidențiat faptul că sistemul piruvat dehidrogenază este sediul unui control metabolic riguros realizat esențial prin modificarea sa covalentă, respectiv prin trecerea reversibilă a formei fosfo în defosfo. Conversia defosfopiruvatdehidrogenazei la fosfopiruvatdehidrogenază se realizează în prezența unei kinaze și coincide cu inactivarea enzimei, în timp ce

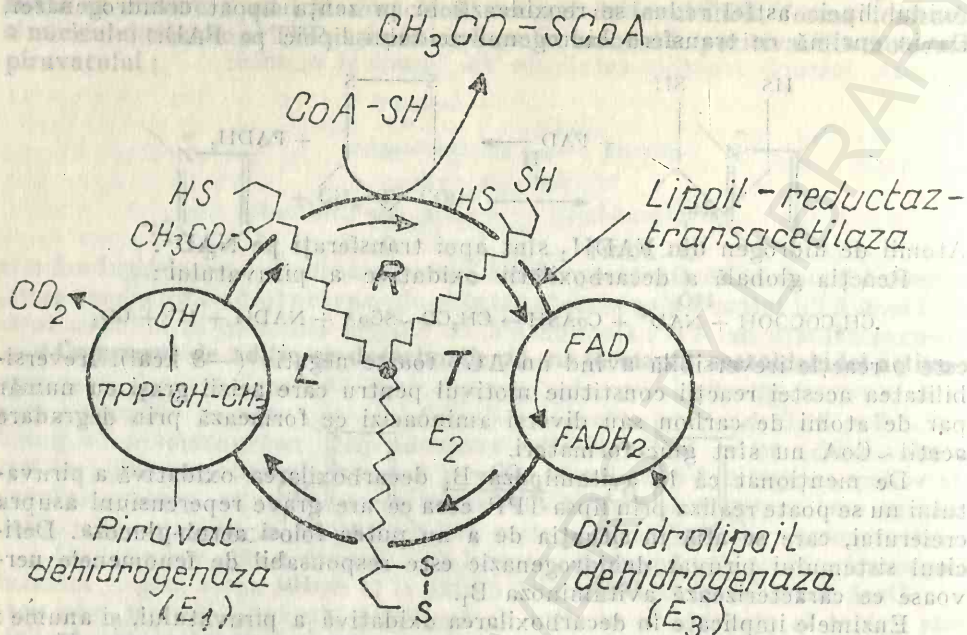


Fig. VII.10 — Organizarea complexului piruvat dehidrogenază.

conversia fosfopiruvatdehidrogenazei la defosfoenzimă este catalizată de o fosfatază specifică și duce la activarea enzimei. Piruvat dehidrogenază kinaza este o enzimă alosterică activată de acetyl~CoA, ATP, NADH și inhibată de piruvat. Când concentrația de acetyl~CoA provenită prin decarboxilarea oxidativă a piruvatului este mare, fapt ce denotă satisfacerea cu combustibil a ciclului Krebs (în aceste condiții există și cantități mari de ATP și NADH), iar în ficat și satisfacerea cu substrate a procesului de neolipogeneză (sinteza de acizi grași din acetyl~CoA provenit din glucoză), piruvat dehidrogenaza, respectiv glicoliza, este inactivată; decarboxilarea piruvatului în continuare ar fi un nonsens. În condiții de depleție glucidică, situație în care se recurge la acizi grași ca sursă energetică, acetyl~CoA și NADH rezultate prin  $\beta$ -oxidarea acizilor grași inactivează piruvat dehidrogenaza, astfel încât glucoza, rezultată numai prin gluconeogeneză, nu va mai fi sacrificată pentru furnizarea de combustibil (acetyl~CoA) pentru ciclul Krebs.

### VII.3.3. CICLUL ACIZILOR TRICARBOXILICI (CICLUL KREBS)

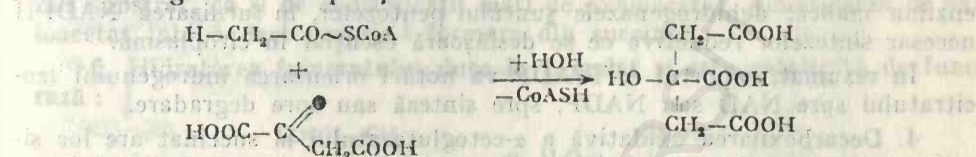
Ciclul acizilor tricarboxilici reprezintă o succesiune de reacții prin parcurgerea cărora fragmentul acetyl~CoA este oxidat pînă la CO<sub>2</sub>. Etapele ciclului au fost postulate și demonstrate ulterior de către Hans Krebs care, cu cîțiva ani înainte, elucidase etapele procesului de ureogeneză.



Introducerea fragmentului acetyl-CoA în ciclul Krebs se realizează prin condensarea sa cu oxaloacetatul. Parcurgerea acestui ciclu, urmată de oxidarea hidrogenului în lanțul respirator, se soldează cu oxidarea totală a acetyl-CoA (în cursul căreia se formează 12 moli ATP/mol acetyl-CoA) și regenerarea oxaloacetatului.

Amorsarea secvenței de reacții presupune condensarea acetyl-CoA cu oxaloacetatul în urma căreia se formează citrat. Reacția este catalizată de citrat sintetază și reprezintă în fapt o condensare aldolică între oxaloacetat (componenta carbonilică) și acetyl-CoA (componenta metilenică). Absența fenomenului de mezomerie în tioesteri este responsabilă de efectul atrăgător de

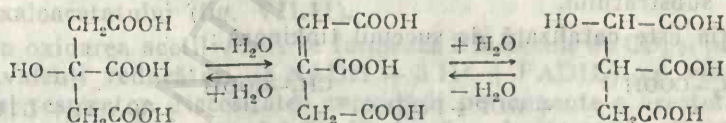
electroni al grupei  $\text{>CO}$  din gruparea  $-\text{C}(=\text{O})\text{S-CoA}$ , având ca rezultat labilizarea hidrogenului din poziția  $\alpha$ .



Citrat sintetaza este o enzimă alosterică inhibată de ATP, ca și de succinil-CoA, intermediar al ciclului Krebs. Scăderea afinității citrat sintetazei pentru acetyl-CoA, la concentrații mari de ATP, permite ciclului Krebs să-și adapteze ritmul la necesitățile energetice ale țesuturilor.

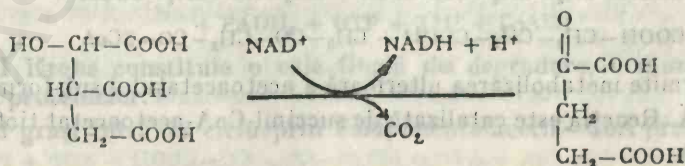
De remarcat că în ficat formarea citratului reprezintă o răspîntie metabolică extrem de importantă în care se hotărăște soarta acetatului activ. Acesta se poate angaja nu numai în calea catabolică reprezentată de etapele ulterioare ale ciclului Krebs, ci și în biosinteza acizilor grași. Citratul și izocitratul sint activatori alosterici ai acetyl-CoA-carboxilgazei, enzimă ce inițiază sinteza acizilor grași; acumularea acestor substraturi ale ciclului Krebs va favoriza biosinteza acizilor grași. Reamintim că citratul se comportă ca efector alosteric negativ al fosfofructo-1-kinazei, enzima cheie a glicolizei.

2. Într-o etapă ulterioară, citratul este izomerizat la izocitrat prin intermediul acidului cis-aconitic sub acțiunea aconitazei:



Echilibrul care se stabilește între cele trei forme depinde de viteza de oxidare a acidului izocitric sub acțiunea izocitrat dehidrogenazei. Trecerea acidului citric în acid izocitric este inhibată de acidul fluoracetic.

3. Sub acțiunea izocitrat dehidrogenazei, izocitratul suferă o oxidare însoțită de decarboxilare, formînd  $\alpha$ -cetoglutarat:

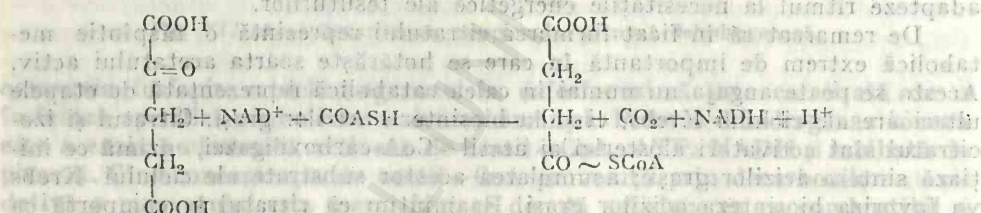


A fost demonstrată existența a două tipuri de izocitrat dehidrogenază: una NAD dependentă, prezentă exclusiv intramitocondrial și cealaltă NADP dependentă, avînd o dublă localizare: intramitocondrială și citoplasmatică. Enzima NAD dependentă este o enzimă aloterică avînd ca efectör pozitiv ADP, ceea ce sugerează că ea este forma implicată în desfășurarea ciclului Krebs, cale catabolică avînd ca scop sinteza de ATP. Activarea enzimei prin ADP antrenează faptul că, ori de cîte ori concentrația ADP este mare, enzima își mărește semnificativ activitatea. Simultan, activitatea întregului ciclu crește, etapa catalizată de izocitrat dehidrogenaza fiind etapa limitantă de viteză. Enzima este inhibată aloteric și de către NADH.

Izocitrat dehidrogenaza NADP dependentă este, dimpotrivă, inhibată de ADP și stimulată de ATP. Cum enzima este activă în condiții ce favorizează sintezele (ATP crescut), s-a conchis că enzima este implicată, alături de enzima malică, dehidrogenazele șuntului pentozelor, în furnizarea NADPH necesar sintezelor reductive ce se desfășoară esențial în citoplasmă.

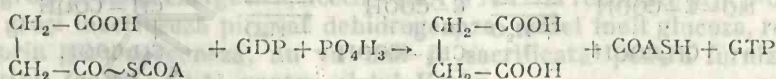
În rezumat, raportul ATP/ADP va hotărî orientarea hidrogenului izocitratului spre NAD sau NADP, spre sinteză sau spre degradare.

4. Decarboxilarea oxidativă a  $\alpha$ -cetoglutaratului la succinat are loc similar cu decarboxilarea piruvatului. Ea necesită prezența sistemului multienzimatic  $\alpha$ -cetoglutarat dehidrogenază care utilizează drept cofactori TPP, acid lipoic, COASH, NAD, FAD. Energia eliberată la oxidare este încorporată sub forma unei legături tiol esterice în succinil ~ CoA:

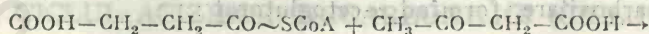


Succinil ~ CoA, în prezența GDP și fosfatului anorganic, formează GTP și succinat. Se formează o legătură fosfat macroergică realizată prin fosforilare la nivelul substratului.

Reacția este catalizată de succinil tiokinază:



O altă modalitate de transformare a succinil ~ CoA la succinat este reprezentată, exclusiv în țesuturile extrahepatice, de transferul CoA pe acetoacetat — un „corp cetonice“:



Reacția permite metabolizarea ulterioară a acetoacetatului sub formă de acetoacetil ~ CoA. Reacția este catalizată de succinil-CoA-acetoacetat tioforaza (vezi cetogeneza).



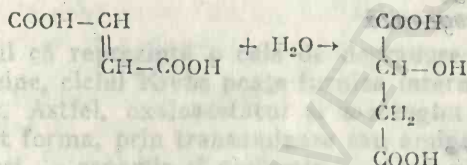
$\alpha$ -Cetoglutarat dehidrogenaza este, ca și piruvat dehidrogenaza, inhibată de produșii reacției enzimice, și anume de succinil-CoA și NADH. De asemenea enzima este sensibilă la încărcarea energetică a celulei, fiind inhibată de ATP.

5. Oxidarea succinatului la fumarat se realizează prin acțiunea succinat-dehidrogenazei, enzimă a lanțului respirator avînd drept coenzimă FAD:

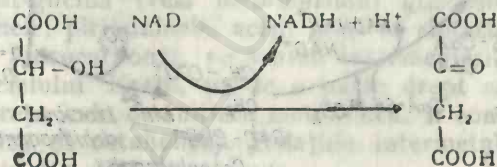


Oxidarea succinatului la fumarat este inhibată competitiv de malonat, un fals substrat, ca și de concentrații mari de oxaloacetat. Acumularea de oxaloacetat inhibă deci propria-i formare din succinat.

6. Hidratarea fumaratului duce la L-malat și este catalizată de fumarază:



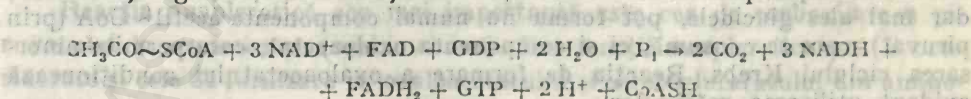
7. Oxidarea malatului la oxaloacetat se realizează sub acțiunea malat-dehidrogenazei:



Derularea ciclului Krebs duce deci la oxidarea acetil~CoA și regenerarea oxaloacetatului (fig. VII.11).

Prin oxidarea acetil~CoA se formează 2 molecule de  $\text{CO}_2$  și patru perechi de echivalenți reducători ( $3 \text{ NADH} + 3 \text{ H}^+ + \text{FADH}_2$ ) ce vor fi oxidați în lanțul respirator. Necesitatea reoxidării permanente a acestora la nivelul lanțului respirator permite ciclului Krebs să se desfășoare exclusiv în condiții de aerobioză (spre deosebire de glicoliză). Oxaloacetatul regenerat poate accepta o nouă moleculă de acetil~CoA pe care o introduce în ciclu.

Reacția globală de desfășurare a ciclului Krebs se poate formula:



Ciclul Krebs constituie o cale finală de degradare, comună glucidelor, lipidelor, proteinelor.

Acizii grași intră în ciclu prin componenta acetil~CoA produs al  $\beta$ -oxidării.

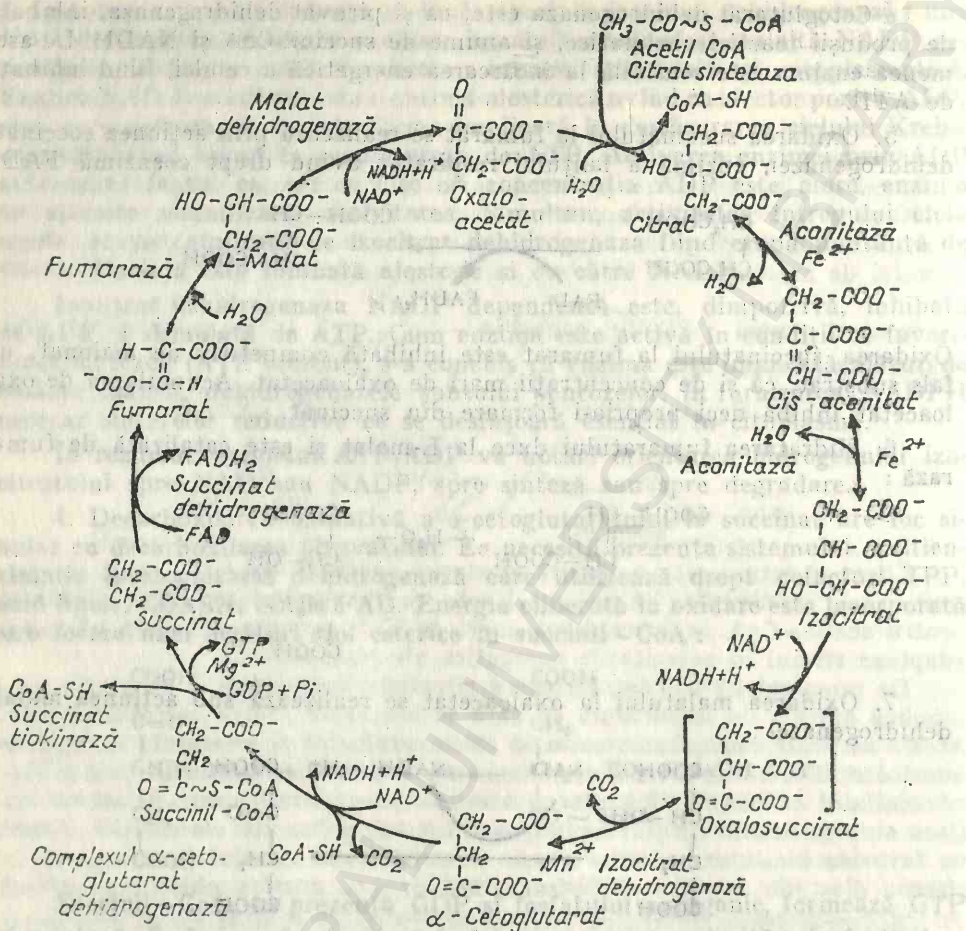
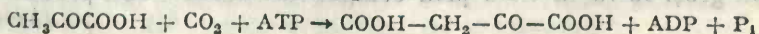


Fig. VII.11 — Ciclu acizilor tricarboxilici (Cicluul Krebs).

Aminoacizii glucoformatori (glutamat, aspartat, arginină, prolină, histidină, valină, metionină, serină, glicocol, treonină, cisteină, tirozină, fenilalanină) se catabolizează pe căi proprii dând naștere la intermediari ai ciclului Krebs. Aminoacizii cetoformatori (leucină, fenilalanină) generează acetil~CoA (vezi metabolismul aminoacizilor).

De remarcat că acizii grași ca și aminoacizii cetoformatori pot furniza exclusiv componenta acetil~CoA. Spre deosebire de aceștia, unii aminoacizi, dar mai ales glucidele, pot forma nu numai componenta acetil~CoA (prin piruvat), care se consumă, ci și componenta oxaloacetat, care permite amor-sarea ciclului Krebs. Reacția de formare a oxaloacetatului condiționează evident utilizarea grăsimilor.

Formarea oxaloacetatului are loc esențial prin carboxilarea piruvatului sub acțiunea piruvat carboxilgazei, enzimă localizată intramitocondrial și care necesită biotina drept grupare prostetică.





Piruvat carboxiligaza este o enzimă alosterică a cărei activitate depinde de prezența acetil~CoA — efector pozitiv al enzimei; în absența acestuia, enzima este complet inactivă. Creșterea concentrației acetil~CoA va induce creșterea activității piruvat carboxiligazei, favorizând astfel intrarea restului acetil în ciclul de oxidare, prin cuplare cu oxaloacetatul. Diminuarea concentrației de acetil~CoA favorizează activitatea piruvat dehidrogenazei, enzimă ce catalizează formarea acetil~CoA.

Piruvat carboxiligaza este, așa cum se va arăta, prima enzimă a gluconeogenezei. Orientarea piruvatului spre gluconeogeneză sau spre ciclul Krebs va fi decisă în ultimă instanță de disponibilitățile energetice ale țesuturilor.

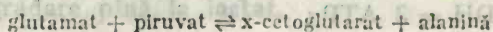
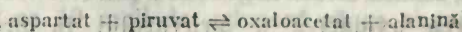
### VII.3.3.1. Ciclul Krebs — cale amfibolică

Pe lângă faptul că reprezintă o cale de degradare comună pentru glucide, lipide și proteine, ciclul Krebs poate furniza intermediarii săi diverselor procese metabolice. Astfel, oxaloacetatul și  $\alpha$ -cetoglutaratul, cei doi cetoacizi ai ciclului, pot forma, prin transaminare sau aminare reductivă, aminoacizii corespunzători — aspartic și glutamic — dacă celula îi reclamă. Acidul aspartic constituie un punct de plecare în biosinteza pirimidinelor. Succinatul, alt intermediar al ciclului Krebs, este antrenat în biosinteza hemului prin ciclul succinat-glicină (vezi metabolismul glicocolului). Aspartatul, glutamatul, porfirinele, pirimidinele, acizii grași se sintetizează, își construiesc deci scheletul hidrocarbonat, pe seama intermediarilor ciclului Krebs.

Funcționarea ciclului Krebs, pe de o parte drept cale catabolică, iar pe de altă parte drept cale de inițiere metabolică, îl consacră ca pe o cale amfibolică (anabolică și catabolică). Relațiile intermetabolice ale ciclului Krebs sînt redată în fig. VII.12.

Utilizarea în diferite procese biosintetice a intermediarilor ciclului Krebs necesită, evident, mecanisme complementare ce permit refacerea acestora. Reacțiile care permit furnizarea intermediarilor ciclului Krebs poartă numele de reacții anaplerotice. De menționat că enzimele anaplerotice acționează la puncte de ramificare metabolică, acțiunea lor constînd în devierea unei cantități dintr-un metabolit al unei căi catabolice pe o cale ce formează legături carbon-carbon. Este necesar ca acțiunea lor să fie promptă ori de cîte ori se produce depleția unui metabolit și să-și înceteze la fel de prompt activitatea cînd concentrația metabolitului a fost restabilită.

Reacția anaplerotică cea mai importantă este cea de carboxilare a piruvatului la oxaloacetat (vezi mai sus). Tot reacții anaplerotice pot fi considerate și cele de furnizare a oxaloacetatului și  $\alpha$ -cetoglutaratului din aminoacizii corespunzători, aspartat respectiv glutamat, prin reacții de transaminare:



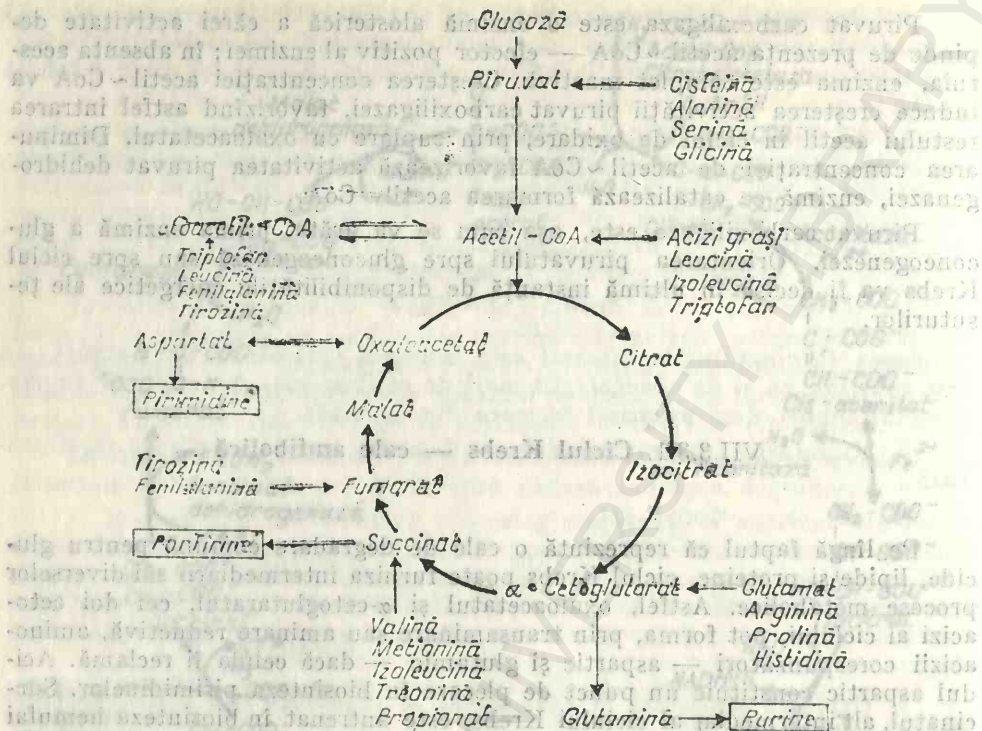


Fig. VII.12 — Ciclul Krebs — cale amfibolică.

### VII.3.3.2. Bilanțul energetic al arderii glucozei

În succesiunea de reacții ce reprezintă ciclul Krebs, semnificative din punct de vedere energetic sînt reacțiile de oxidare. În ciclul Krebs, reacțiile de oxidare se soldează cu formarea de echivalenți reducători: NADH, FADH<sub>2</sub>. Oxidarea coenzimelor reduse are loc la nivelul lanțului respirator, proces în cursul căruia, prin cuplarea oxidării cu fosforilarea, este generat ATP, monedă „forte” a metabolismului energetic. Cuplarea reacțiilor ciclului Krebs cu lanțul respirator este posibilă grație localizării intramitochondriale și vecinătății spațiale a sistemelor enzimactice implicate în cele două procese. Oxidarea NADH duce, așa cum s-a arătat, la formarea a 3 moli ATP, în timp ce oxidarea FADH<sub>2</sub> dă naștere la 2 moli ATP.

Pentru stabilirea bilanțului energetic al oxidării piruvatului, vom urmări etapele oxidative și bilanțul lor energetic.

Etapele catalizate de dehidrogenaze NAD dependente, care se soldează cu formarea NADH, deci a cite 3 moli ATP, sînt:

— decarboxilarea oxidativă a piruvatului în prezența piruvat dehidrogenazei → NADH = 3 ATP;



— dehidrogenarea izocitratului în prezența izocitrat dehidrogenazei NAD dependente  $\rightarrow \text{NADH} = 3 \text{ ATP}$ ;

— decarboxilarea oxidativă a  $\alpha$ -cetoglutaratului în prezența  $\alpha$  ceto-glutarat dehidrogenazei  $\rightarrow \text{NADH} = 3 \text{ ATP}$ ;

— dehidrogenarea malatului în prezența malat dehidrogenazei  $\rightarrow \text{NADH} = 3 \text{ ATP}$ .

Etapa de oxidare a succinatului la fumarat se face în prezența FAD și duce la 2 moli ATP.

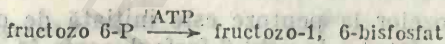
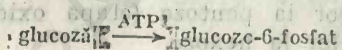
În afara etapelor oxidative, care reclamă cuplarea acestora cu catena de oxidație celulară în vederea formării ATP, există în ciclul Krebs o etapă care sintetizează ATP la nivelul substratului și anume etapa conversiei succinil-CoA (obținut prin decarboxilarea oxidativă a  $\alpha$ -cetoglutaratului) la succinat.

Însumând numărul de moli de ATP rezultați prin oxidarea unui mol de piruvat în ciclul Krebs cuplat cu catena de oxidație celulară se obține un total de 15 moli ATP.

Oxidarea unui mol de acetyl-CoA furnizează 12 moli ATP. Ținând seama că trei sferturi, până la nouă zecimi din glucoză parcurge, în vederea oxidării, calea Embden-Meyerhof și apoi ciclul Krebs cuplat cu lanțul respirator, bilanțul energetic al oxidării totale a unei molecule de glucoză trebuie să ia în considerație și etapele până la formarea piruvatului. În condiții de aerobioză, NADH rezultat în etapa catalizată de gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenază se oxidează la nivelul lanțului respirator, furnizind 3 moli ATP pentru fiecare mol de gliceraldehidă, deci 6 moli pentru un mol glucoză.

În calea Embden-Meyerhof există două etape în care ATP se obține prin fosforilare la nivelul substratului, și anume etapa conversiei 1,3-bisfosfogliceratului la 3-fosfoglicerat și cea a conversiei fosfoenolpiruvatului la piruvat. Prin fosforilare la nivelul substratului rezultă în total 4 moli ATP.

Numărul total de moli ATP formați prin oxidarea glucozei la piruvat este deci 10. Cum însă 2 moli se consumă în reacțiile catalizate de kinaze,



ciștigul net este de 8 moli ATP.

Oxidarea celor 2 moli de piruvat rezultați în calea Embden-Meyerhof furnizează 30 moli ATP, deci bilanțul oxidării complete a unui mol de glucoză până la  $\text{CO}_2$  și apă este de 38 moli ATP. Considerând că  $\Delta G'_0$  de hidroliză a legăturii fosfat terminale din molecula ATP este de  $-7,3 \text{ kcal}$ , prin oxidarea glucozei în condiții de aerobioză se eliberează  $38 \times 7,3 = 277 \text{ kcal/mol}$  glucoză.

Ținând seama că oxidarea glucozei în condiții standard ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{ O}_2 \rightarrow 6 \text{ CO}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O}$ ) generează 686 kcal/mol se poate conchide că randamentul de utilizare a energiei libere mobilizată în acest proces este de  $40\% \left( \frac{276}{686} \cdot 100 \right)$ . Evident, eficiența termodinamică a degradării oxidative complete a glucozei este superioară glicolizei. Pentru obținerea a 38 moli de ATP este necesar ca 19 moli de glucoză să se angajeze, în condiții de anaerobioză, în degradare până la lactat.

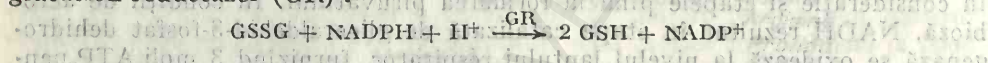
## VII.4. ALTE CĂI DE DEGRADARE A GLUCOZEI

### VII.4.1. CALEA PENTOZO-FOSFAȚILOR

#### (ȘUNTUL PENTOZO-FOSFAT)

o importantă posibilitate de evoluție metabolică a glucozo-6-fosfatului o reprezintă calea pentozo-fosfaților. Rațiunea biologică a acestei căi, în care etapele oxidative sînt catalizate de dehidrogenaze NADP dependente, este, în primul rînd, producerea NADPH necesar tuturor biosintezelor reductive (spre deosebire de NADH care este oxidat în vederea obținerii de ATP). Cum calea pentozo-fosfat se desfășoară în fracția citoplasmatică, consumatorul nemijlocit și cantitativ major al NADPH îl reprezintă biosinteza acizilor grași, proces localizat de asemenea în citoplasmă. Biosinteza colesterolului, a hormonilor steroizi, ca și hidroxilarea unor compuși străini organismului, ca primă etapă în metabolizarea acestora, necesită echivalenți reductori tot sub forma NADPH.

Reducerea glutatoniului oxidat la glutatun redus — tripeptid de importanță majoră pentru menținerea integrității enzimelor tiolice și prevenirea peroxidării lipidice — se realizează pe seama NADPH, cofactor al glutatun-reductazei (GR):



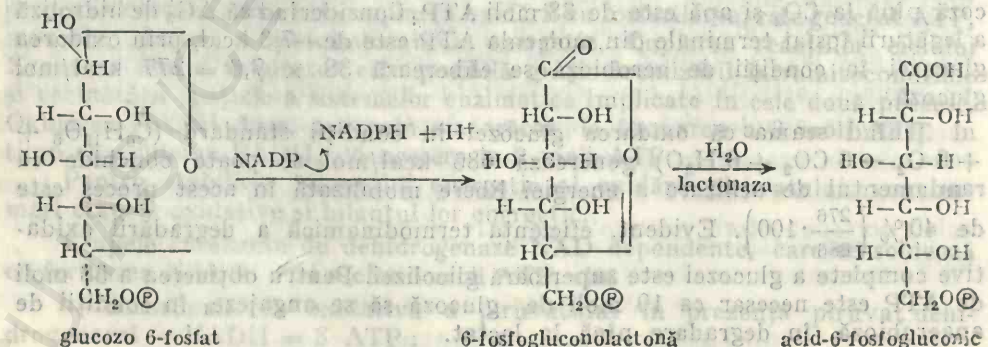
Importanța căii pentozelor ca furnizor major de echivalenți reductori necesari biosintezelor reductive este sprijinită de faptul că viteza acestuia este maximă în țesuturi în care lipogeneza și sinteza de hormoni steroizi sînt deosebit de intense, respectiv țesutul adipos, glanda mamară în lactație, ficat, corticosuprarrenală.

În același timp, importanța căii pentozelor constă în furnizarea de pentoze necesare biosintezei nucleotidelor și acizilor nucleici.

Desfășurarea căii pentozelor implică două etape majore, și anume:

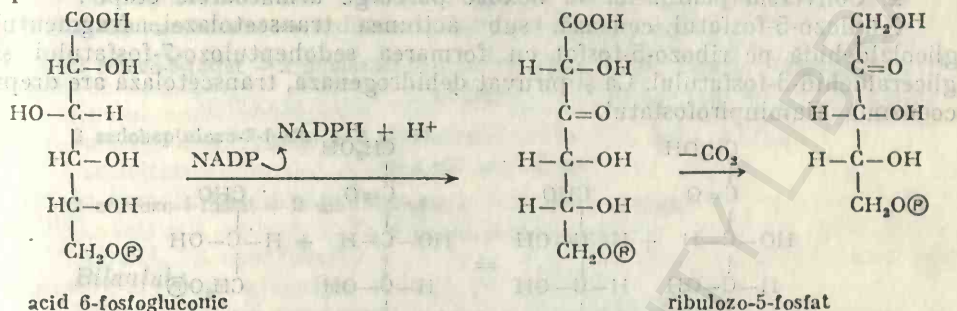
1. conversia hexozelor la pentoze (etapa oxidativă);
2. conversia pentozelor la hexoze.

1. Conversia hexozelor la pentoze este inițiată de oxidarea NADP dependentă a glucozo-6-fosfatului la acid 6-fosfogluconic în prezența glucozo-6-fosfat dehidrogenazei; intermediar se formează 6-fosfogluconolactona care sub acțiunea δ-lactonazei este hidrolizată la acidul corespunzător. De menționat specificitatea glucozo-6-fosfat dehidrogenazei pentru anomerul β:



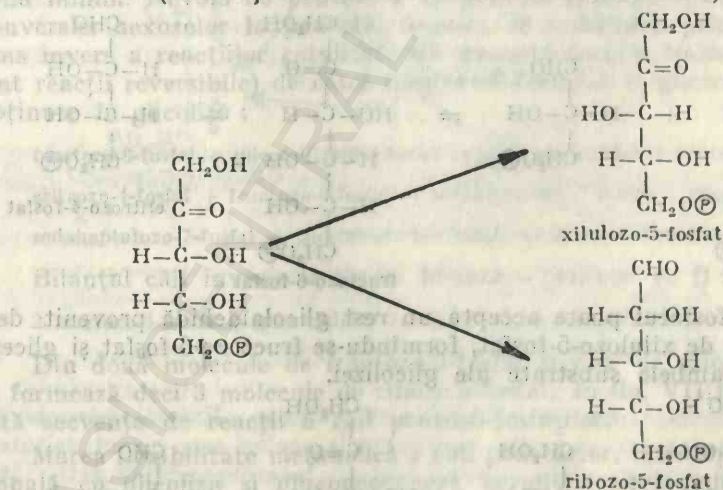


Într-o etapă ulterioară are loc oxidarea acidului 6-fosfogluconic la acid 3-ceto-6-fosfogluconic care este decarboxilat simultan la ribulozo-5-fosfat. Enzima care catalizează această etapă, 6-fosfogluconat dehidrogenaza NADP dependentă, realizează deci oxidarea decarboxilantă a substratului său :



Activitatea 6-fosfogluconat dehidrogenazei este inhibată de către fructozo-1,6-bisfosfat, substrat al glicolizei. Creșterea concentrației acestuia va produce deci o relativă blocare a șuntului în această etapă, astfel încît conversia ulterioară a pentozelor la hexoze, eventuale substraturi ale glicolizei, nu se mai produce. Mai mult, întrucît 6-fosfogluconatul este un inhibitor al 6-fosfoglucoizomerazei, enzimă ce introduce glucozo-6-fosfatul în glicoliză, acumularea acestuia ca răspuns la creșterea substratelor glicolizei (fructozo-1,6-bisfosfatul) va determina inhibiția căii glicolitice. Această corelație reglatoare reciprocă a celor două căi este evidentă avantajoasă pentru celulă.

Ribulozo-5-fosfatul este convertit la epimerul său, xilulozo-5-fosfatul (sub acțiunea ribulozo-5-fosfat epimerazei), ca și la aldoozomerul său, ribozo-5-fosfatul (sub acțiunea ribozo-5-fosfat cetoizomerazei).



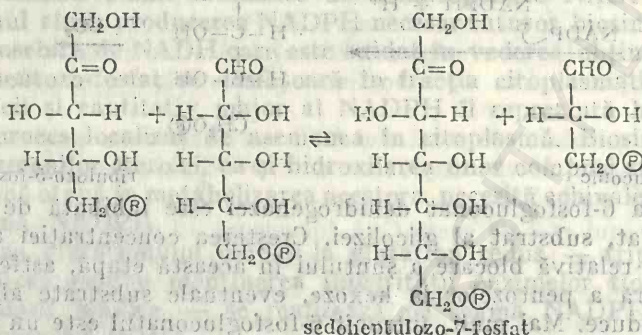
Pentozele rezultate sînt utilizate în sinteza acizilor nucleici, a coenzimelor, a compușilor macroergici sau sînt metabolizate în continuare.

În țesuturile în care nevoia de NADPH și de pentoză este echilibrată, calea pentozo-fosfaților parcurge exclusiv etapa transformării hexozelor în pentoză. Dacă însă nevoia de NADPH a țesuturilor este mai mare decît cea

de pentoză (ca în țesuturile cu lipogeneză intensă), pentozele obținute în exces față de necesități vor fi reconvertite la hexoză care vor fi reintroduse în etapele oxidative descrise, furnizind NADPH necesar.

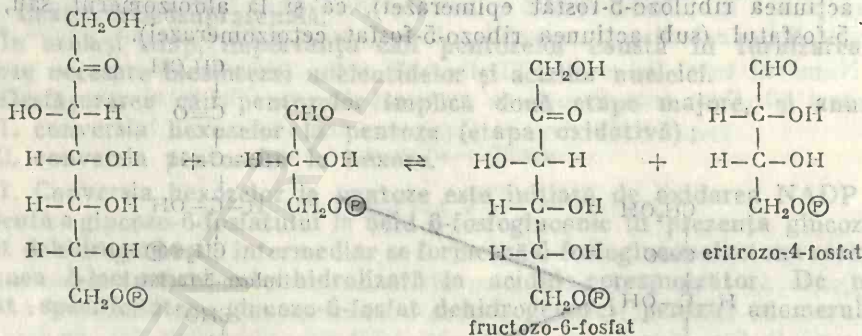
2. Conversia pentozelor la hexoză parcurge următoarele etape:

Xilulozo-5-fosfatul cedează, sub acțiunea transcetolazei, fragmentul glicolaldehidă pe ribozo-5-fosfat cu formarea sedoheptulozo-7-fosfatului și gliceraldehid-3-fosfatului. Ca și piruvat dehidrogenaza, transcetolaza are drept coenzimă tiaminpirofosfatul.

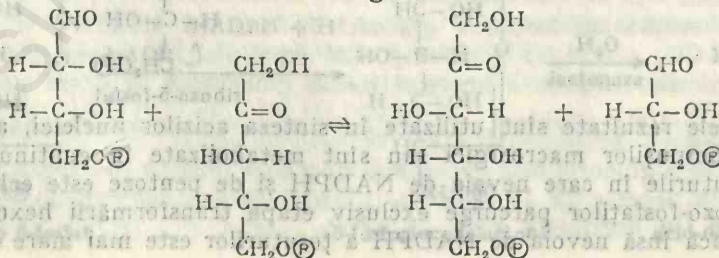


Formarea gliceraldehid-3-fosfatului reprezintă un punct de interferență a glicolizei cu șuntul pentozelor.

Sedoheptulozo-7-fosfatul, rezultat în reacția de transcetolizare, suferă o reacție de transaldolizare (transfer al restului dihidroxiacetona) pe gliceraldehid 3-fosfat în urma căreia iau naștere eritrozo-4-fosfatul și fructozo-6-fosfatul, intermediar comun al glicolizei și căii pentozelor.

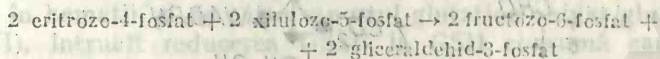
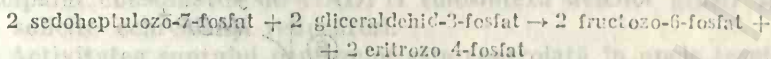
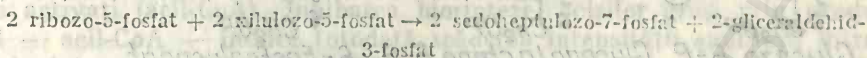
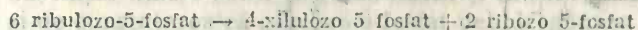
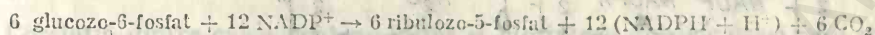


Eritrozo-4-fosfatul poate accepta un rest glicolaldehidă provenit de la o altă moleculă de xilulozo-5-fosfat, formându-se fructozo-6-fosfat și gliceraldehid-3-fosfat, ambele substraturi ale glicolizei.

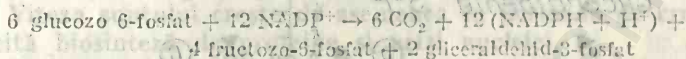




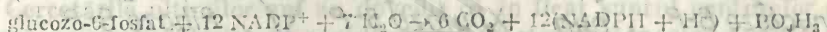
Desfășurarea reacțiilor oxidative și neoxidative ale șuntului poate fi sumarizată :



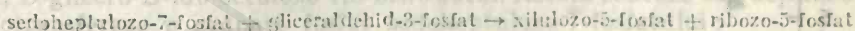
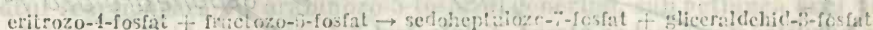
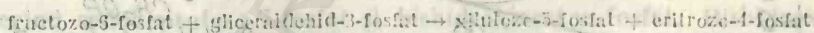
**Bilanțul :**



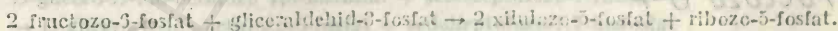
Gliceraldehid-3-fosfatul se poate izomeriza la dihidroxiaceton-fosfat, formînd împreună fructozo-1,6-difosfatul. Cum acesta din urmă suferă acțiunea fructozo-1,6-bisfosfatazei, rezultă că din 6 molecule de glucozo-6-fosfat se obțin 5 molecule de fructozo-6-fosfat care prin parcurgerea etapelor gluconeogenezei formează 5 molecule de glucozo-6-fosfat. Bilanțul net al căii pentozelor ar fi deci oxidarea unei molecule de glucoză, conform ecuației :



În unele țesuturi, cum ar fi mușchiul, enzimele etapelor oxidative ale șuntului pentozelor au activități extrem de reduse, necesarul de NADPH fiind minim. Nevoia de pentoze a mușchiului presupune totuși posibilitatea conversiei hexozelor la pentoze. Aceasta se realizează prin parcurgerea în sens invers a reacțiilor catalizate de transaldolază și transeololază (ambele sînt reacții reversibile) de către fructozo-6-fosfatul și gliceraldehid-3-fosfatul obținute în glicoliză :



Bilanțul căii inverse a etapei hexoze - pentoze va fi :



Din două molecule de fructozo-6-fosfat și una de gliceraldehid-3-fosfat se formează deci 3 molecule de ribozo-5-fosfat. În fig. VII.13 este reprezentată secvența de reacții a căii pentozo-fosfaților.

Marea flexibilitate metabolică a căii pentozelor, interdependența sa funcțională cu glicoliza și gluconeogeneza permit acestora adaptarea promptă la necesitățile diverselor țesuturi, în diferite momente metabolice.

Amploarea desfășurării căii pentozelor depinde de starea fiziologică a celulei. Cum sensul desfășurării sale este producerea NADPH, necesar biosintezelor reductive, ca și producerea de pentoze necesare sintezei nucleotidelor și acizilor nucleici, este de așteptat ca amploarea sa să fie paralelă cu ampla-

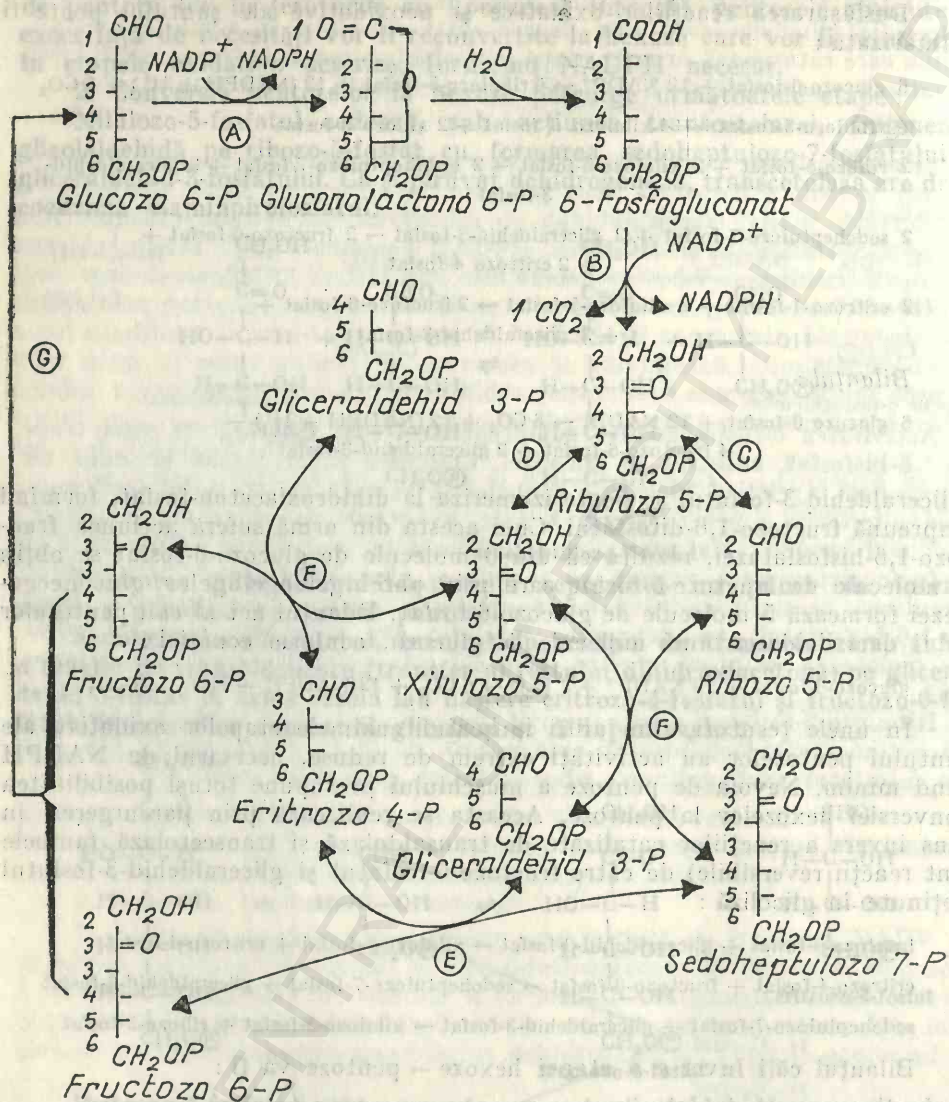


Fig. VII.13. — Calea pentoze-fosfaților în țesutul adipos.

rea proceselor consumatoare de NADPH și pentoze. Există într-adevăr dovada că intensitatea șuntului este modificată în același sens cu intensitatea biosintezei acizilor grași de către anumiți factori. Interdependența activității căii pentoze și căii de biosinteză a acizilor grași se realizează în primul rând prin faptul că viteza șuntului este controlată de NADPH, substrat al lipogenezei. Pe lângă faptul că este cofactor al glucozo-6-fosfat dehidrogenazei, NADPH este și inhibitor alosteric al acestei enzime. Este clar că reoxidarea NADPH va produce accelerarea șuntului. Cum calea majoră de oxidare a NADPH este biosinteza acizilor grași, intensitatea acesteia va decide acți-



vitatarea glucozo 6-fosfat dehidrogenazei, deci a şuntului. Creşterea raportului NADP/NADPH reprezintă un semnal ce induce oxidarea glucozei pe calea şuntului pentozelor, aşa cum creşterea raportului NAD/NADH induce glicoliza.

Corelaţia dintre calea pentozo-fosfat şi biosinteza acizilor graşi este atestată şi de constatarea că glucozo-6-fosfat dehidrogenaza este inhibată de acizii graşi activaţi (acil-CoA). Inhibarea biosintezei acizilor graşi prin produsul final — acil-CoA — induce totodată scăderea intensităţii şuntului, întrucît principalul consumator de NADPH (biosinteza acizilor graşi) încetează să mai solicite echivalenţi reducători.

Activitatea şuntului pentozelor este controlată în unele ţesuturi, în special în hematii, şi de către raportul glutatation-oxidat/glutatation-reduc (GSSG/GSH), întrucît reducerea GSSG la GSH consumă cantităţi semnificative de NADPH. La concentraţii mari de GSSG în eritrocit, viteza şuntului creşte întrucît acţiunea glutatation reductazei necesită NADPH.

Viteza şuntului creşte de asemenea în perioada de creştere rapidă, care solicită biosinteza de proteine şi acizi nucleici.

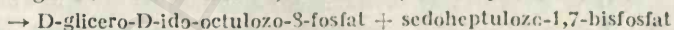
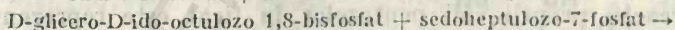
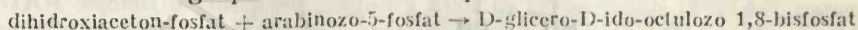
De remarcat că activitatea şuntului poate fi reglată nu numai la nivelul activităţii enzimelor, ci şi la cel al biosintezei acestora. Astfel, glucozo-6-fosfat dehidrogenaza şi 6 fosfogluconat-dehidrogenaza sînt enzime adaptative a căror viteză de sinteză variază cu necesităţile de desfăşurare a şuntului. Sinteza dehidrogenazelor creşte, de exemplu, în glanda mamară în perioada de lactaţie sau scade în ficat şi ţesutul adipos în diabet şi inanţie (insulina se comportă ca inductor al dehidrogenazelor).

Cercetările ultimilor ani au dovedit că în ficat şuntul pentozelor se desfăşoară pe o cale diferită de cea deserisă, caracteristică pentru ţesutul adipos. Diferenţele rezultă din posibilitatea ribozo-5-fosfatului de a se epimeriza, sub acţiunea unei pentozo-5-fosfat-2'-izomeraze proprii ficatului, la arabinozo-5-fosfat.

Ca şi în calea deserisă, o moleculă de ribozo 5-fosfat acceptă într-o reacţie de transecetolizare gruparea  $\text{CH}_2\text{OH}$  (glicolaldehidă) de la xilulozo-5-fosfat,



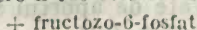
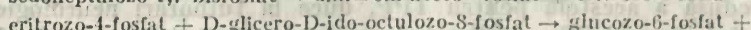
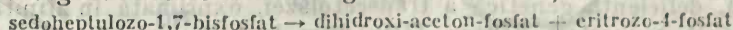
generînd sedoheptulozo-7-fosfat şi bishidroxiaceton-fosfat. Bishidroxiaceton-fosfatul reacţionează cu arabinozo-5-fosfatul generînd, sub acţiunea unei aldolaze, D-glicero-D-ido-octulozo-1,8-bisfosfatul. Acesta cedează sub acţiunea unei fosfotransferaze o grupare fosfat sedoheptulozo-7-fosfatului :



Sedoheptulozo-1,7-bisfosfatul, sub acţiunea unei aldolaze, se scindează la dihidroxiaceton-fosfat şi eritrozo-4-fosfat ; acesta din urmă, într-o reacţie de transecetolizare, acceptă restul  $\text{CH}_2\text{OH}$  de pe D-glicero-D-ido-octulozo



8-fosfat generîndu-se hexozele glucozo 6-fosfat şi fructozo-6-fosfat :



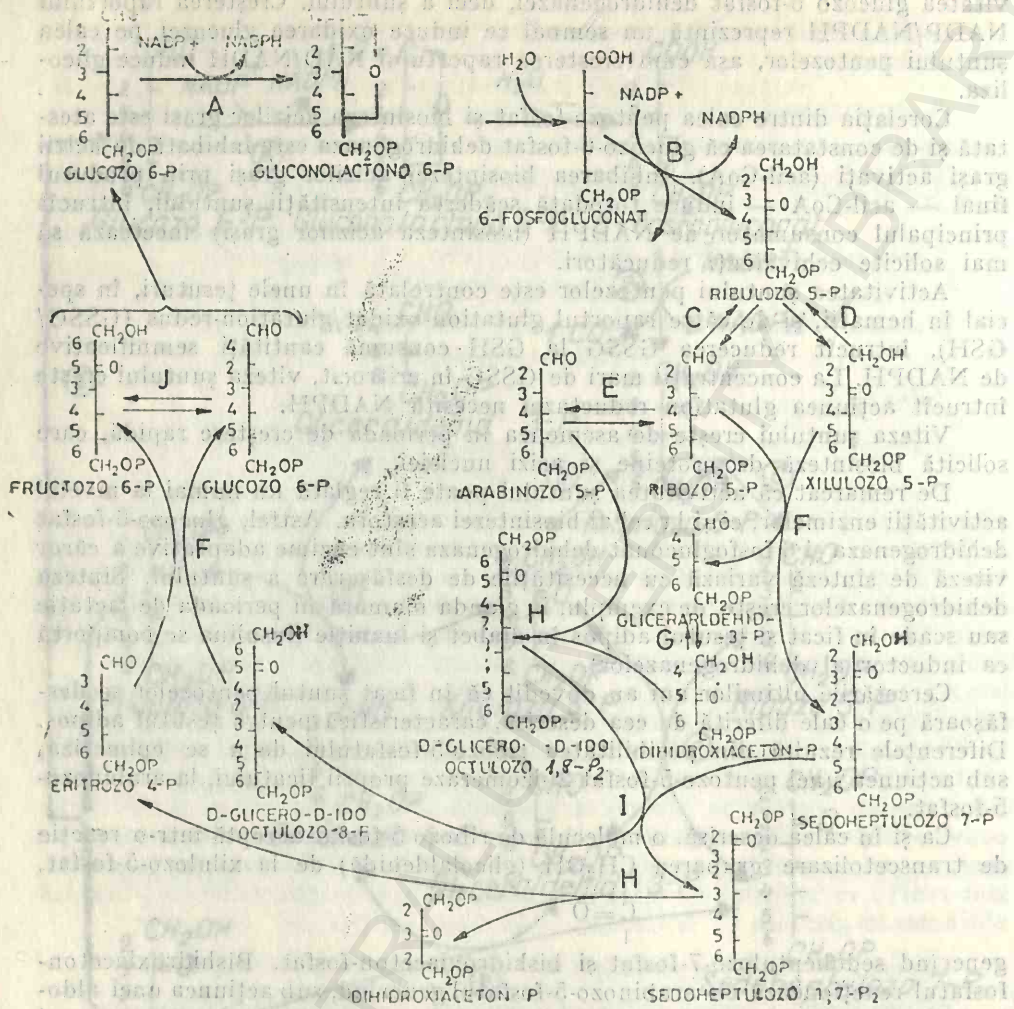


Fig. VII.11 - Căea pentoze-fosfaților în ficat.

Secvența de reacții proprii căii pentozeelor în ficat este reprezentată în fig. VII.14.

#### VII.4.1.1. Deficiențe ale unor enzime implicate în calea pentozeelor

Deficiența ereditară a unor enzime ale căii pentozeelor poate constitui cauza unor dezordini foarte grave, mai ales în condiții de mediu favorizante. Dintre acestea, deficiența genetică a transcetolazei, exprimată în afinitatea extrem de redusă a acesteia pentru TPP, duce la tulburări neurologice și comportamentale importante, agravate de aportul scăzut de tiamină în dietă (sindromul Wernicke-Korsakoff).



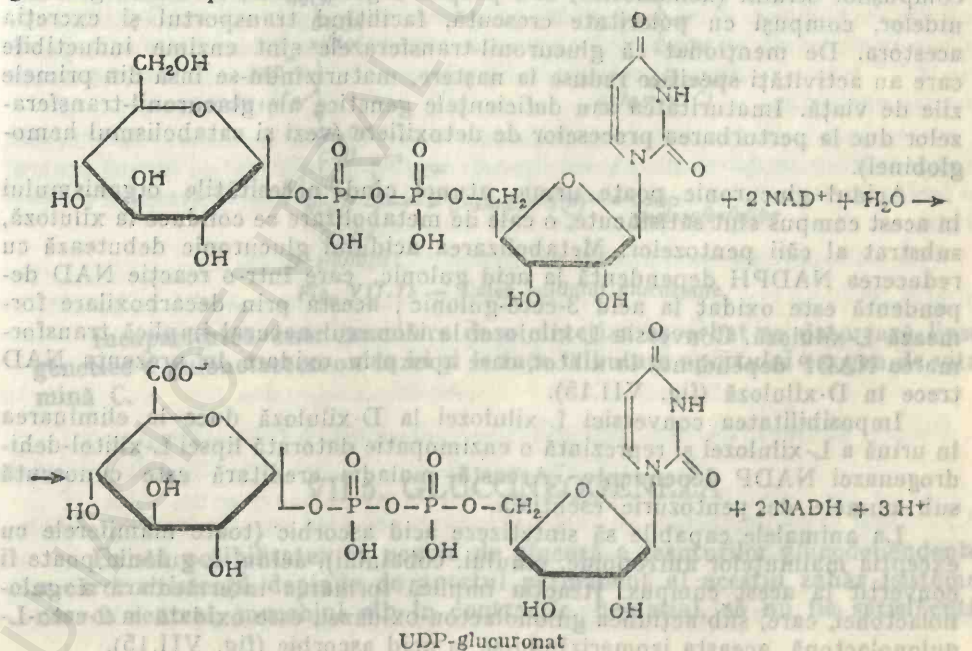
Altă deficiență — aceea de glucozo-6-fosfat dehidrogenază — se manifestă în special în eritrocit unde calea pentozelor este unica sursă de NADPH (lipsește malic enzima și izocitrat dehidrogenază). Deficiența enzimatică se exprimă în susceptibilitatea crescută la hemoliză a eritrocitului, rezultat al faptului că reacția de reducere a GSSG este inoperantă prin lipsa NADPH. Acumularea de GSSG nu permite descompunerea diversilor peroxizi pe seama GSH, ceea ce expune membrana eritocitară la stressul oxidativ realizat esențial prin  $H_2O_2$ . Modificarea arhitecturii bistratului lipid-proteic membranar face eritrocitul susceptibil la hemoliză. Ca și în primul caz, deficiența este accentuată de administrarea unor medicamente cu caracter oxidant (antimalarice). Frecvența foarte mare a deficienței de glucozo-6-fosfat dehidrogenază, la indivizii care trăiesc în regiuni infestate de malarie, reprezintă o încercare de adaptare la mediu, întrucât parazitul malariei este dependent de concentrații optime de GSH, deci implicit de buna funcționare a căii pentozelor.

#### VII.4.2. CALEA ACIDULUI GLUCURONIC

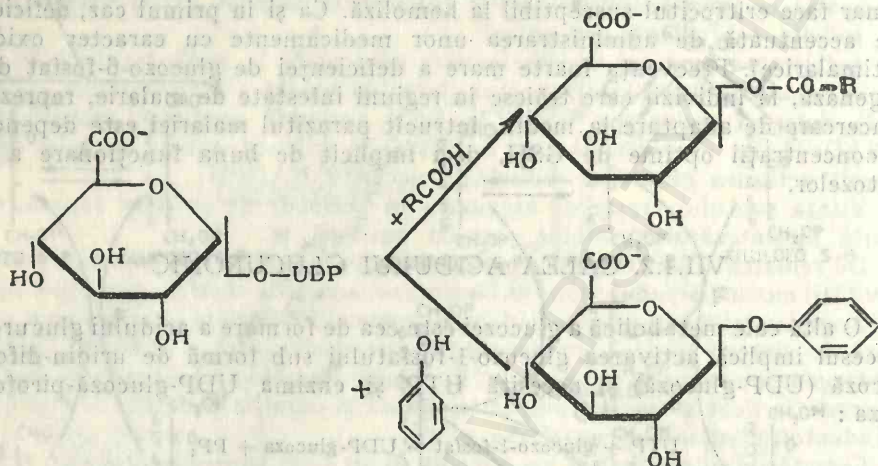
O altă cale metabolică a glucozei este cea de formare a acidului glucuronic. Procesul implică activarea glucozo-1-fosfatului sub formă de uridin-difosfat glucoză (UDP-glucoză) și necesită UTP și enzima UDP-glucoză-pirofosforilaza :



UDP-glucoza poate servi ca donator de glucoză în sinteza di- și polizaharidelor sau poate fi oxidată la UDP-glucuronat, în prezența unei dehidrogenaze NAD-dependente :



UDP-glucuronatul reprezintă forma activă a glucuronatului. El poate servi ca donator de rest glucuronic în reacția de sinteză a unor polizaharide acide (vezi proteoglicani) că și în reacția de conjugare cu diverși compuși endo- sau exogeni din clasa aminelor, fenolilor, acizilor carboxilici. Conjugarea cu glucuronatul, catalizată de glucuronil transferaze, enzime prezente în special în ficat, conduce la glucuronide (compuși de natură glicozidică având configurație  $\beta$ ):



Conjugarea cu glucuronatul reprezintă o etapă importantă în detoxifierea compușilor străini (xenobiotice) sau proprii organismului, formarea glucuronidelor, compuși cu polaritate crescută, facilitând transportul și excreția acestora. De menționat că glucuronil-transferazele sînt enzime inductibile care au activități specifice reduse la naștere, maturizîndu-se însă din primele zile de viață. Imaturitatea sau deficiențele genetice ale glucuronil-transferazelor duc la perturbarea proceselor de detoxifiere (vezi și catabolismul hemoglobinei).

Acidul glucuronic poate urma, atunci cînd necesitățile organismului în acest compus sînt satisfăcute, o cale de metabolizare ce conduce la xiluloză, substrat al căii pentozelor. Metabolizarea acidului glucuronic debutează cu reducerea NADPH dependentă la acid gulonic, care într-o reacție NAD dependentă este oxidat la acid 3-cetō-gulonic; acesta prin decarboxilare formează L-xiluloză. Conversia L-xilulozei la izomerul natural implică transformarea NADP dependentă la xilitol, care apoi prin oxidare în prezența NAD trece în D-xiluloză (fig. VII.15).

Imposibilitatea conversiei L-xilulozei la D-xiluloză duce la eliminarea în urină a L-xilulozei și reprezintă o enzimopatie datorată lipsei L-xilitol-dehidrogenazei NADP dependente. Această maladie ereditară este cunoscută sub numele de pentozurie esențială.

La animalele capabile să sintetizeze acid ascorbic (toate mamiferele cu excepția maimușelor antropoide, omului, cobaiului), acidul L-gulonic poate fi convertit la acest compus. Reacția implică formarea intermediară a gulonolactonei, care, sub acțiunea gulonolacton-oxidazei, este oxidată la 2-ceto-L-gulonolactonă, aceasta izomerizîndu-se la acid ascorbic (fig. VII.15).



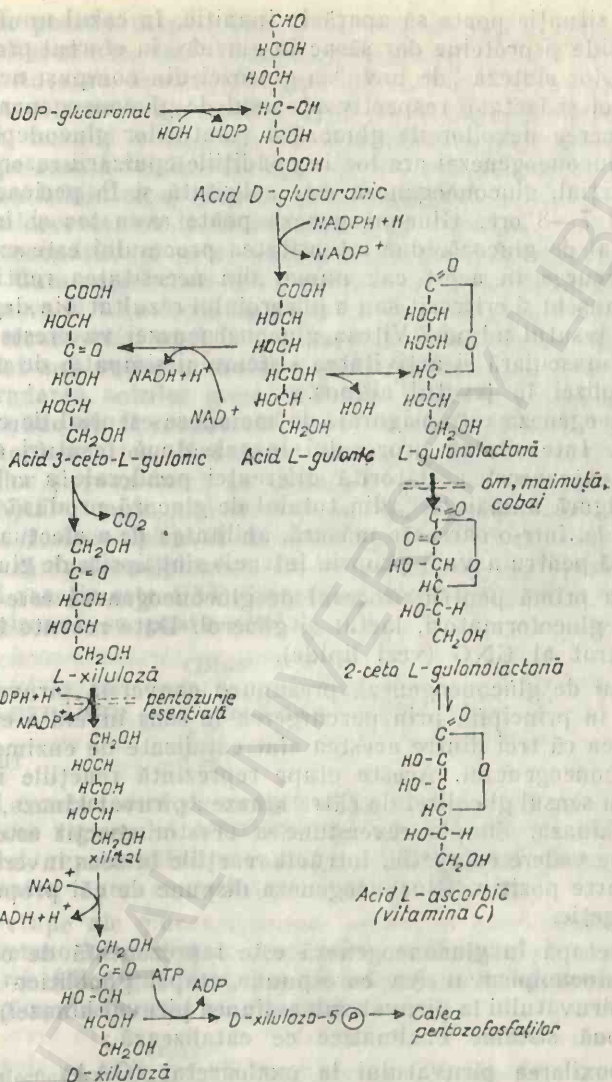


Fig. VII.15 — Calea acidului glucuronic.

Incapacitatea unor mamifere de a sintetiza ascorbat se datorează lipsei genetice a gulonolacton-oxidazei și le face tributare aportului exogen de vitamină C.

## VII.5. GLUCONEOGENEZA

Există posibilitatea ca nevoia de glucoză a țesuturilor glucodependente, a căror existență depinde de aportul permanent al acestui zahăr (sistemul nervos central, mușchiul alb în contracție, hematia), să nu fie satisfăcută.

O astfel de situație poate să apară în inanție, în cazul unui regim alimentar bogat în lipide și proteine dar sărac în glucide, în efortul prelungit. În aceste condiții are loc sinteza „de novo” a glucozei din compuși neglucidici (aminoacizi, glicerol și lactat), respectiv procesul de gluconeogeneză (GNG).

Satisfacerea nevoilor de glucoză a țesuturilor glucodependente exclusiv pe seama gluconeogenezei are loc în condițiile epuizării rezervelor de glicogen hepatic. Parțial, gluconeogeneza este solicitată și în perioade interprandiale ce depășesc 7—8 ore. Gluconeogeneza poate avea loc și în condițiile unui aport normal de glucoză, dar intensitatea procesului este extrem de redusă. Procesul decurge în acest caz numai din necesitatea reutilizării lactatului format în mușchi și eritrocit sau a glicerolului rezultat din degradarea trigliceridelor din țesutul adipos. Viteza gluconeogenezei va crește proporțional cu activitatea musculară și activitatea sistemului simpatic de care depinde amplarea lipolizei în țesutul adipos.

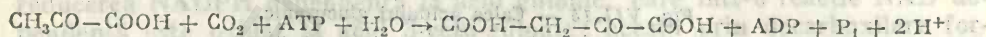
Gluconeogeneza este asigurată la mamifere esențial de către ficat și cortexul renal. Intensitatea procesului în cele două țesuturi este aproximativ egală. Cu toate acestea, datorită diferenței ponderale a celor două organe rinichiul asigură numai 20% din totalul de glucoză produsă. Creierul și mușchiul au și ele, într-o oarecare măsură, abilitatea de a efectua gluconeogeneza, exclusiv însă pentru nevoile proprii, întrucât sînt lipsite de glucozo-6 fosfatază.

Materia primă pentru procesul de gluconeogeneză este reprezentată de aminoacizii glucoformatori, lactat și glicerol. Date recente indică și acetona drept substrat al GNG (vezi lipide).

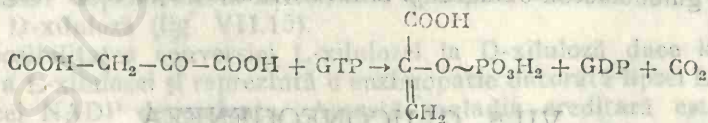
Procesul de gluconeogeneză presupune conversia piruvatului la glucoză și decurge, în principiu, prin parcurgerea în sens invers a etapelor glicolizei, cu mențiunea că trei dintre acestea sînt catalizate de enzime unidirecționale, proprii gluconeogenezei. Aceste etape reprezintă reacțiile inverse reacțiilor catalizate în sensul glicolizei de către kinaze: piruvat kinaza, fosfofructo-1-kinaza, hexokinaza. Simpla reversiune a acestor reacții este dezavantajoasă din punct de vedere energetic, întrucât reacțiile în sens invers ce le corespund au  $\Delta G'$  foarte pozitiv. Gluconeogeneza dispune de căi proprii ce evită acest impas energetic.

Prima etapă în gluconeogeneză este reprezentată de conversia piruvatului la fosfoenolpiruvat (ea corespunde etapei glicolitice de transformare a fosfoenolpiruvatului la piruvat sub acțiunea piruvat kinazei) și implică coooperarea a două sisteme enzimatice ce catalizează:

a. carboxilarea piruvatului la oxaloacetat (OAA)



b. conversia OAA la fosfoenolpiruvat (PEP)



Consumul mare de energie pe care-l presupune această reacție face din gluconeogeneză un mare consumator de ATP.

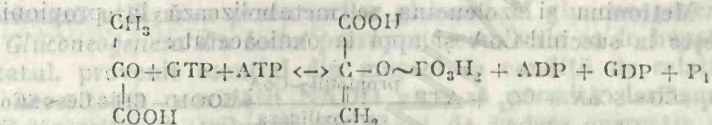
Conversia piruvatului la oxaloacetat decurge întramitocondrial și este catalizată de piruvat carboxilază (PCL), enzimă biotin dependentă, avînd



ca efector alosteric pozitiv acetil~CoA. Piruvatul (provenit esențial din alanină), ajuns în mitocondrie, este orientat spre formarea prin carboxilare a oxaloacetatului și nu spre decarboxilare oxidativă, întrucît acetil~CoA, formată prin degradarea excesivă a acizilor grași în condiții de gluconeogeneză (în lipsa glucozei, nevoile energetice ale țesuturilor glucoindependente se satisfac exclusiv pe seama trigliceridelor), este un efector pozitiv al piruvat-carboxilgazei și un inhibitor al piruvat dehidrogenazei.

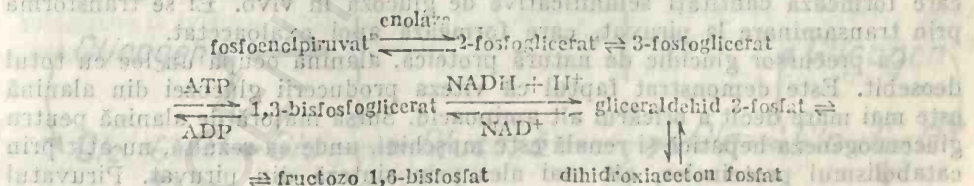
Conversia oxaloacetatului la fosfoenolpiruvat decurge, la majoritatea speciilor, extramitocondrial și este catalizată de fosfoenolpiruvat carboxikinază (PEPCK). Cum membrana mitocondrială este impermeabilă pentru oxaloacetat, acesta va fi translocat în citozol prin conversia la compuși permeabili ce pot fi reconvertiți apoi la oxaloacetat. Într-adevăr, oxaloacetatul dă naștere la malat sub acțiunea malat dehidrogenazei, în prezența NADH provenit din degradarea acizilor grași. Malatul, permeabil prin membrană, ajunge în citozol unde va fi reconvertit la oxaloacetat sub acțiunea malat-dehidrogenazei citoplasmatic. Reducerea oxaloacetatului la malat în interiorul mitocondriilor și reoxidarea sa extramitocondrială este favorizată de raportul NADH/NAD<sup>+</sup>, mult mai crescut în mitocondrie decît în citozol.

Sub acțiunea fosfoenolpiruvat carboxikinazei, oxaloacetatul ajuns în citoplasmă formează fosfoenolpiruvat. De remarcat că donatorul de fosfat specific în această reacție este GTP. Reacția globală de formare a fosfoenolpiruvatului din piruvat se poate scrie :



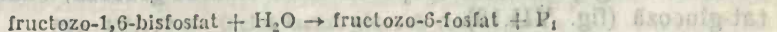
Cum  $\Delta G_0'$  al reacției este de numai +0,2 kcal rezultă că reacția este reversibilă. Creșterea raportului ATP/ADP favorizează reacția de formare a fosfoenolpiruvatului, reprezentînd o condiție a desfășurării gluconeogenezei, alături de necesitatea unor concentrații mari de piruvat.

Următoarele etape ale gluconeogenezei presupun convertirea fosfoenolpiruvatului la fructozo-1,6-bisfosfat. Aceasta se realizează prin parcurgerea în sens invers a reacțiilor glicolizei, reacții catalizate de enzime bidirecționale — comune gluconeogenezei și glicolizei :



De remarcat că NADH necesar reducerii 3-fosfogliceratului la gliceraldehid-3-fosfat provine tot din  $\beta$ -oxidarea acizilor grași.

Transformarea fructozo-1,6-bisfosfatului la fructozo-6-fosfat nu se face prin simpla reversiune a reacției catalizate de fosfofructokinază ( $\Delta G' = +3,4$  kcal), ci necesită, din motive deja expuse, intervenția unei enzime proprii, fructozo-1,6-bisfosfataza :

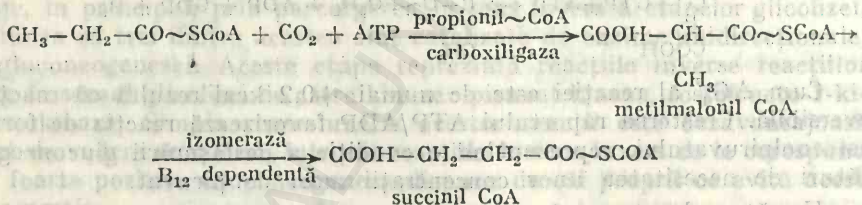


Fructozo-1,6-bisfosfataza este o enzimă alosterică stimulată de ATP și inhibată atât de fructozo-1,6-bisfosfat — substratul său, cât și de fructozo-2,6-bisfosfat.

Fructozo-6-fosfatul formează, sub acțiunea hexozoizomerazei, enzimă bidirecțională, glucozo-6-fosfatul care, sub acțiunea glucozo-6-fosfatazei, enzimă unidirecțională, este hidrolizat la glucoză. Localizarea enzimei în ficat asigură acestuia rolul de furnizor al glucozei pentru satisfacerea nevoilor energetice și de sinteză ale țesuturilor extrahepatice. Este posibil ca glucozo-6-fosfatul, rezultat al gluconeogenezei, să fie utilizat, după conversia la glucozo-1-fosfat, în sinteza glicogenului. Orientarea glucozo-6-fosfatului spre formarea de glucoză sau spre sinteza de glicogen va fi decisă, în cele din urmă, de raportul de concentrație dintre glicogenul hepatic și glucoza sanguină.

Aşa cum s-a menţionat anterior, materia primă pentru procesul de gluconeogeneză este reprezentată de proteine, glicerol şi lactat. Vom urmări modalităţile de transformare a acestora în substraturi direct utilizabile în gluconeogeneză.

Accesul proteinelor la gluconeogeneză, respectiv al aminoacizilor glucoformatori (toți, cu excepția leucinei), se realizează prin transformarea lor în substrat ale ciclului Krebs, direct convertibile la oxaloacetat sau piruvat. Astfel, glutamatul, glutamina, histidina, arginina, prolina participă la gluconeogeneză prin formare de  $\alpha$ -cetoglutarat, care, prin parcurgerea ciclului Krebs, formează oxaloacetat. Aspartatul generează direct oxaloacetat prin transaminare. Metionina și izoleucina se metabolizează la propionil-CoA, ce se convertește la succinil-CoA și apoi la oxaloacetat:



Tirozina și fenilalanina sînt convertibile la oxaloacetat prin fumarat, produsul de catabolism al celor doi aminoacizi (fig. VII.12). Deși toți aminoacizii enumerați sînt potențial gluconeogeni, alanina, serina și glicina sînt cei care formează cantități semnificative de glucoză în via. Ei se transformă prin transaminare la piruvat, care formează apoi oxaloacetat.

Ca precursor glucidic de natură proteică, alanina ocupă un loc cu totul deosebit. Este demonstrat faptul că viteza producerii glucozei din alanină este mai mare decât a oricărui alt aminoacid. Sursa majoră de alanină pentru gluconeogeneza hepatică și renală este mușchiul, unde ea rezultă, nu atât prin catabolismul proteinelor, cât mai ales prin sinteză din piruvat. Piruvatul muscular derivă din glucoză, respectiv din glicogenul muscular și din aminoacizi ce se pot converti la piruvat. Înainte de a părăsi mușchiul, piruvatul se transaminează la alanină, în special pe seama aminoacizilor ramificați care se metabolizează preferențial în mușchi și nu în ficat. Alanina formată în mușchi ajunge în ficat, unde furnizează scheletul hidrocarbonat pentru sinteza „de novo” a glucozei. Secvența de reacții descrisă este considerată de către Felig și Malette drept un ciclu alanină-glucoză, analog ciclului lactat-glucoză (fig. VII.16).



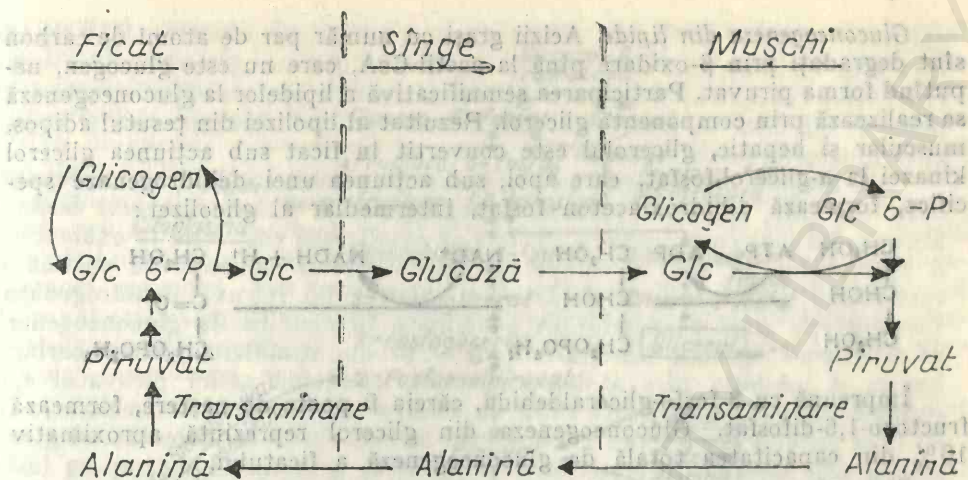


Fig. VII.16 — Ciclul alanină-glucoză (Ciclul Felig-Malette).

De remarcat că alanina, pe lângă faptul că furnizează substrat gluconeogenezei, intervine și în reglarea procesului în țesutul hepatic, inhibind piruvat kinaza. Blocînd conversia fosfoenolpiruvatului la piruvat, alanina favorizează utilizarea precursorilor glucozei în gluconeogeneză.

**Gluconeogeneza din lactat** presupune conversia sa în hepatocit la piruvat. Lactatul, provenit esențial din mușchi în condiții de relativă anaerobioză (din necesitatea reoxidării NADH care să permită desfășurarea glicolizei), ca și din eritrocit, tributat din punct de vedere energetic glicolizei, suferă în ficat acțiunea lactat dehidrogenazei, formînd piruvat, care este convertit la fosfoenolpiruvat. Acesta formează, așa cum s-a arătat, glucoză, care poate fi trimisă mușchiului în contracție. Astfel, lactatul provenit din glucoza din mușchi este reconvertit la glucoză în ficat și utilizat ca atare de mușchi (ciclul Cöri) (fig. VII.17).

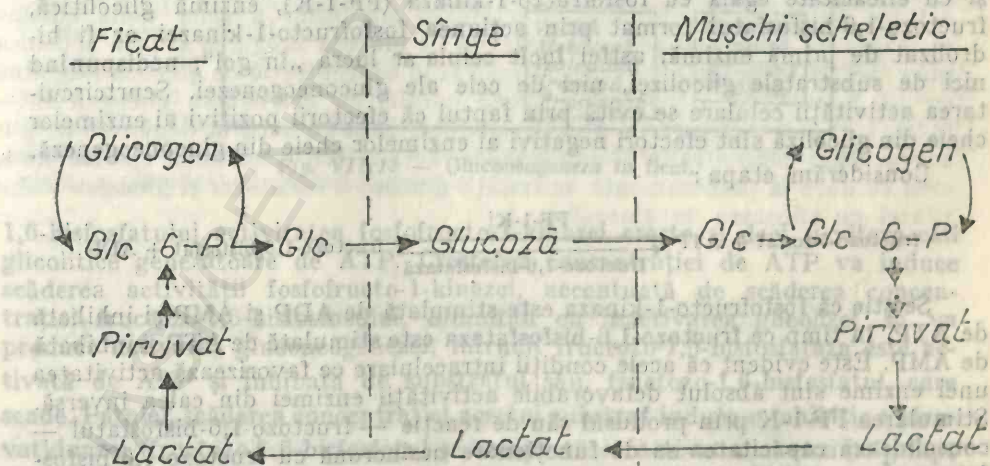
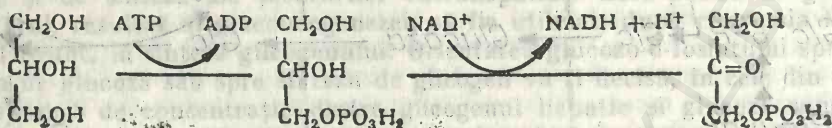


Fig. VII.17 — Ciclul lactat-glucoză (ciclul Cöri).

**Gluconeogeneza din lipide.** Acizii grași cu număr par de atomi de carbon sînt degradați prin  $\beta$ -oxidare pînă la acetyl-CoA, care nu este glucogen, neputînd forma piruvat. Participarea semnificativă a lipidelor la gluconeogeneză se realizează prin componenta glicerol. Rezultat al lipolizei din țesutul adipos, muscular și hepatic, glicerolul este convertit în ficat sub acțiunea glicerol kinazei la  $\alpha$ -glicerol-fosfat, care apoi, sub acțiunea unei dehidrogenaze specifice, formează dihidroxiaceton fosfat, intermediar al glicolizei:



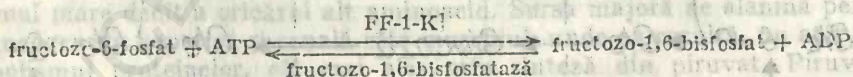
Împreună cu 3-fosfo-gliceraldehida, căreia îi poate da naștere, formează fructozo-1,6-difosfat. Gluconeogeneza din glicerol reprezintă aproximativ 10% din capacitatea totală de gluconeogeneză a ficatului.

Căile gluconeogenezei și intrarea substratelor lipidice și protidice ca și a lactatului în procesul propriu-zis de gluconeogeneză sînt reprezentate în fig. VII.18.

### VII.5.1. REGLAREA ALOSTERICĂ A GLUCONEOGENEZEI

Reglarea gluconeogenezei se realizează esențial prin modularea activității enzimelor cheie — care sînt enzime alosterice — de către anumiți efectori metabolici. Este de remarcat că intensitatea procesului de gluconeogeneză trebuie să fie invers proporțională cu intensitatea glicolizei, întrucît funcționarea sincronă și cu viteze egale a celor două căi ar duce la irosirea substratelor acestora. De exemplu, dacă fructozo-1,6-bisfosfataza ar acționa simultan și cu eficacitate egală cu fosfofructo-1-kinaza (FF-1-K), enzimă glicolitică, fructozo-1,6-bisfosfatul format prin acțiunea fosfofructo-1-kinazei ar fi hidrolizat de prima enzimă, astfel încît celula ar lucra „în gol”, nedispunînd nici de substratele glicolizei, nici de cele ale gluconeogenezei. Scurtcircuitarea activității celulare se evită prin faptul că efectorii pozitivi ai enzimelor cheie din glicoliză sînt efectori negativi ai enzimelor cheie din gluconeogeneză.

Considerăm etapa:



Se știe că fosfofructo-1-kinaza este stimulată de ADP și AMP și inhibată de ATP, în timp ce fructozo-1,6-bisfosfataza este stimulată de ATP și inhibată de AMP. Este evident că acele condiții intracelulare ce favorizează activitatea unei enzime sînt absolut defavorabile activității enzimei din calea inversă. Stimularea FF-1-K prin produsul său de reacție — fructozo-1,6-bisfosfatul — consolidează capacitatea sa de funcționare nesincronă cu fructozo-1,6-bisfosfataza. În condițiile în care concentrația de ATP intracelular este redusă, fosfofructo-1-kinaza este stimulată de ADP. Pe măsura formării fructozo-



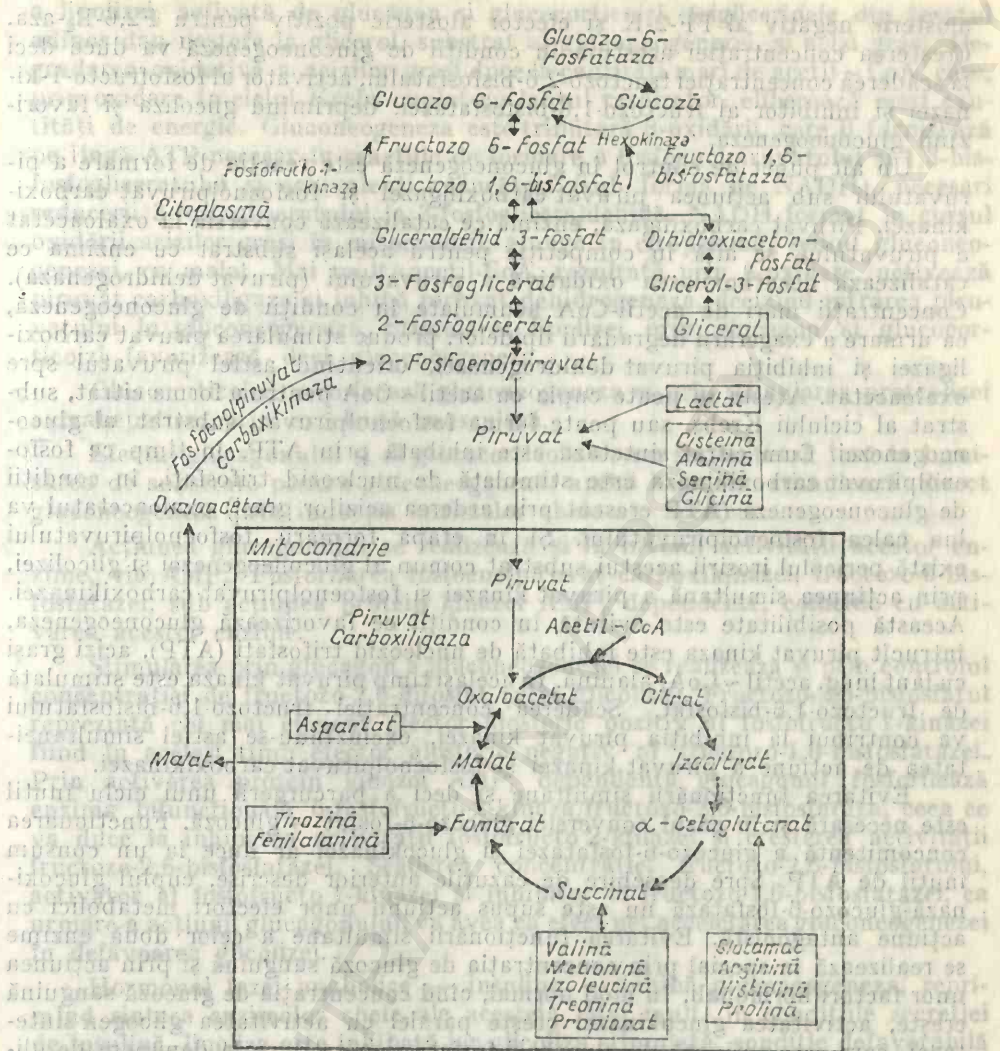


Fig. VII.18 — Gluconeogeneza în ficat.

1,6-bisfosfatului activitatea fosfofructo-1-kinazei crește și deci și viteza căii glicolitice generatoare de ATP. Creșterea concentrației de ATP va induce scăderea activității fosfofructo-1-kinazei, accentuată de scăderea concentrației fructozo-1,6-bisfosfatului. Simultan cu inactivarea glicolizei se va produce activarea gluconeogenezei, întrucât fructozo-1,6-bisfosfataza este activată de ATP și inhibată de substratul său, fructozo-1,6-bisfosfatul, care scade. Paralel, scăderea concentrației acestui substrat induce o inhibiție a piruvatkinazei (fructozo-1,6-bisfosfatul se comportă ca activator al enzimei), fapt ce constrânge fosfoenolpiruvatul să se orienteze spre gluconeogenăză, care se accelerează. De menționat că fosfoenolpiruvatul se comportă ca efector

alosteric negativ al FF-2-K și efector alosteric pozitiv pentru F2,6-P<sub>2</sub>-aza. Creșterea concentrației acestuia în condiții de gluconeogeneză va duce deci la scăderea concentrației fructozo-2,6-bisfosfatului, activator al fosfofructo-1-kinazei și inhibitor al fructozo-1,6-bisfosfatazei, deprinzând glicoliza și favorizând gluconeogeneza.

Un alt punct de control în gluconeogeneză este reacția de formare a piruvatului sub acțiunea piruvat carboxilgazei și fosfoenolpiruvat carboxikinazei. Piruvat carboxilgaza, enzimă ce catalizează conversia la oxaloacetat a piruvatului, se află în competiție pentru același substrat cu enzima ce catalizează decarboxilarea oxidativă a piruvatului (piruvat dehidrogenaza). Concentrații mari de acetyl-CoA acumulate în condiții de gluconeogeneză, ca urmare a exagerării degradării lipidelor, produc stimularea piruvat carboxilgazei și inhibiția piruvat dehidrogenazei, orientând astfel pirivatul spre oxaloacetat. Acesta se poate cupla cu acetyl-CoA pentru a forma citrat, substrat al ciclului Krebs, sau poate forma fosfoenolpiruvat, substrat al gluconeogenezei. Cum citrat sintetaza este inhibată prin ATP, în timp ce fosfoenolpiruvat carboxikinaza este stimulată de nucleozid trifosfați, în condiții de gluconeogeneză (ATP crescut prin arderea acizilor grași) oxaloacetatul va lua calea fosfoenolpiruvatului. Și în etapa formării fosfoenolpiruvatului există pericolul irosirii acestui substrat comun al gluconeogenezei și glicolizei, prin acțiunea simultană a piruvat kinazei și fosfoenolpiruvat carboxikinazei. Această posibilitate este evitată în condiții ce favorizează gluconeogeneza, întrucât piruvat kinaza este inhibată de nucleozid trifosfați (ATP), acizi grași cu lanț lung, acetyl-CoA, alanină. În același timp piruvat kinaza este stimulată de fructozo-1,6-bisfosfat. Scăderea concentrației fructozo-1,6-bisfosfatului va contribui la inhibiția piruvat kinazei, excluzându-se astfel simultaneitatea de acțiune a piruvat kinazei și fosfoenolpiruvat carboxikinazei.

Evitarea funcționării simultane și deci a parcurgerii unui ciclu inutil este necesară și în cazul conversiei glucozo-6-fosfat → glucoză. Funcționarea concomitentă a glucozo-6-fosfatazei și glucokinazei ar duce la un consum inutil de ATP. Spre deosebire de cazurile anterior descrise, cuplul glucokinază-glucozo-6-fosfatază nu este supus acțiunii unor efectori metabolici cu acțiune antagonistă. Evitarea funcționării simultane a celor două enzime se realizează în special prin concentrația de glucoză sanguină și prin acțiunea unor factori hormonal. În mod normal, când concentrația de glucoză sanguină crește, activitatea glucokinazei crește paralel cu activitatea glicogen sintetazei, care este activată de glucozo-6-fosfat, ceea ce duce la depunere de glicogen. Când concentrația glucozei scade, activitățile celor două enzime scad, ceea ce duce la predominanța activității glucozo-6-fosfatazei și glicogen fosforilazei cu eliberare de glucoză.

## VII.5.2. REGLAREA HORMONALĂ A GLUCONEOGENEZEI

Gluconeogeneza se desfășoară, așa cum am văzut, în condițiile în care aprovizionarea țesuturilor glucodependente cu glucoză este deficitară. În aceste condiții, sursă majoră de energie pentru toate celelalte țesuturi devin trigliceridele depozitate în țesutul adipos în cursul fazei anabolice. Ca urmare



a lipolizei, activată de glucagon și glucocorticoizi, trigliceridele din țesutul adipos dau naștere la glicerol, substrat al gluconeogenezei, și acizi grași. Degradarea oxidativă a acizilor grași duce la cantități mari de acetyl-CoA, care, prin oxidare în ciclul Krebs cuplat cu lanțul respirator, eliberează mari cantități de energie. Gluconeogeneza este tributară  $\beta$ -oxidării, care îi furnizează pe lângă ATP necesar în reacțiile de formare a fosfoenolpiruvatului și 1,3-bisfosfogliceratului și echivalenți reducători (sub formă de NADH), necesari reducerii 3-fosfogliceratului la 3-fosfogliceraldehidă. NADH format în cursul oxidării acizilor grași în mitocondrii, ajunge în citoplasmă, sediul gluconeogenezei, ca malat. Mai mult, acetyl-CoA, rezultată prin  $\beta$ -oxidare, activează piruvat carboxilgaza și inhibă piruvat dehidrogenaza, decizînd intrarea piruvatului în gluconeogeneză. Stimularea lipolizei prin glucagon și glucocorticoizi favorizează deci gluconeogeneza.

Glucocorticoizii favorizează gluconeogeneza și prin stimularea proteolizei extrahepatice, prin excelență musculară.

Efectul glucagonului și al glucocorticoizilor nu se limitează însă la furnizarea de substrate pentru gluconeogeneză; ambii hormoni stimulează direct gluconeogeneza prin inducția enzimelor cheie ale acesteia.

Acțiunea glucagonului se realizează și la nivelul activității acestor enzime, via AMP<sub>c</sub>. Fosforilarea fosfoenolpiruvat carboxikinazei, fructozo-6-bisfosfatazei, sub acțiunea protein kinazei AMP<sub>c</sub> dependente, coincide cu activarea acestor enzime.

Stimularea prin glucagon a gluconeogenezei se realizează și prin controlul concentrației de fructozo-2,6-difosfat (vezi glicoliza). Fructozo-2,6-bisfosfatul reprezintă cel mai eficient efectector alosteric pozitiv al fosfofructo-1-kinazei fiind în același timp efectector alosteric negativ al fructozo-1,6-bisfosfatazei. Prin activarea protein kinazei AMP<sub>c</sub> dependentă glucagonul fosforilează enzima bifuncțională 6-fosfofructo-2-kinaza/fructozo-2,6-bisfosfataza, ceea ce va duce la inhibarea activității fosfofructo 2-kinazei și creșterea activității fructozo-2,6-bisfosfatazei. Scăderea concentrației fructozo-2,6-bisfosfatului, activator al fosfofructo 1-kinazei și inhibitor al fructozo-1,6-bisfosfatazei, ca urmare a acțiunii glucagonului, va avea ca efect net accelerarea gluconeogenezei în defavoarea glicolizei.

Hormonul fazei anabolice — insulina — inhibă gluconeogeneza, reprimînd sinteza enzimelor cheie ale acesteia. Mai mult, în condițiile secreției de insulină, lipoliza este inhibată iar glicoliza stimulată, condiție defavorabilă desfășurării gluconeogenezei. În fig. VII.9 se reprezintă modalitățile de reglare a glicolizei și gluconeogenezei.

## VII.6. METABOLISMUL GLICOGENULUI

Așa cum s-a arătat, glicogenul reprezintă forma de depozitare a excesului de glucide în organismele animale, la care se face apel în faza catabolică a metabolismului. Cantități semnificative de glicogen se găsesc în mușchi (1% din greutate) și în ficat (6% din greutate). Depozitele de glicogen sînt

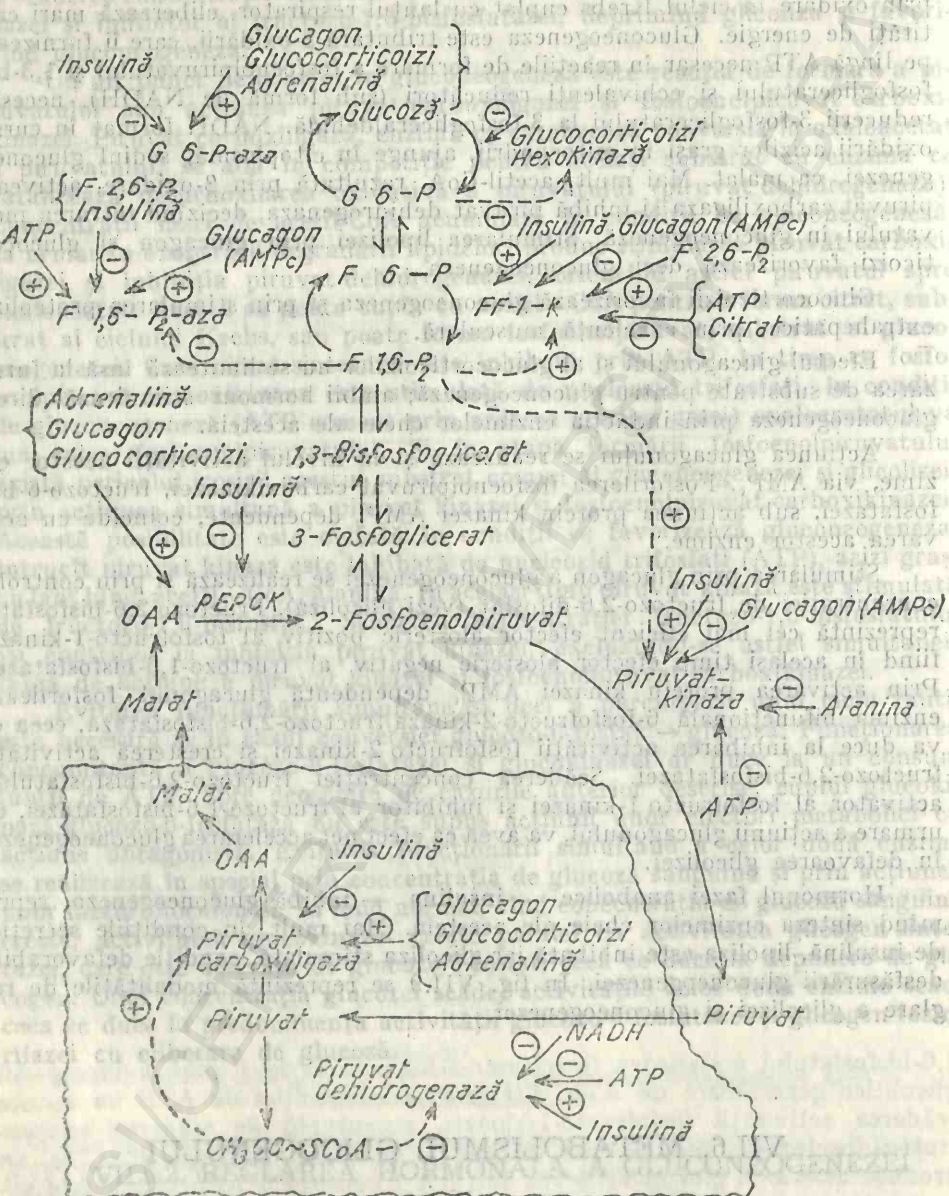


Fig. VII.19 — Reglarea glicolizei și gluconeogenezei.

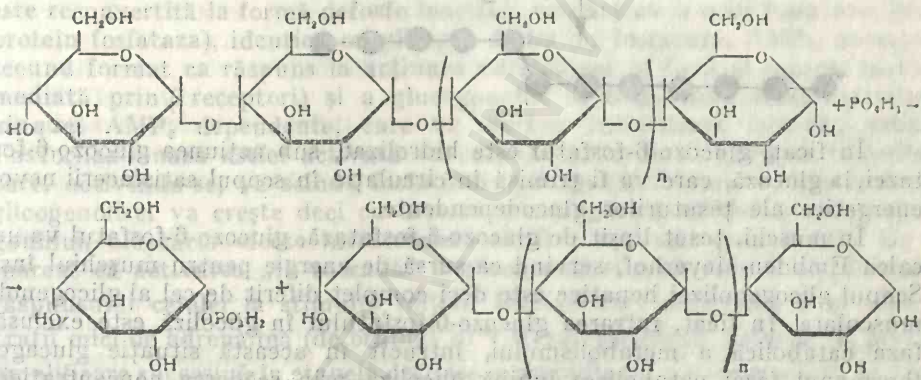


utilizate de către cele două țesuturi în scopuri diferite; ficatul le utilizează în scopul menținerii glicemiei, în timp ce mușchiul își satisface strict necesitățile proprii de glucoză. Rezervele de glicogen scad dramatic în ficat în cursul a 12—20 ore de inanție, iar în mușchi, în cursul exercițiului intens ca urmare a glicogenolizei; ele se refac în faza anabolică a metabolismului, caracterizată prin abundență de substrat energogene.

Glicogenoliza și glicogenosinteza decurg, ca și alte căi metabolice paralele, pe căi distincte ce se conformează principiului general al dualității reglării care asigură funcționarea lor nesincronă.

### VII.6.1. DEGRADAREA GLICOGENULUI (GLICOGENOLIZA)

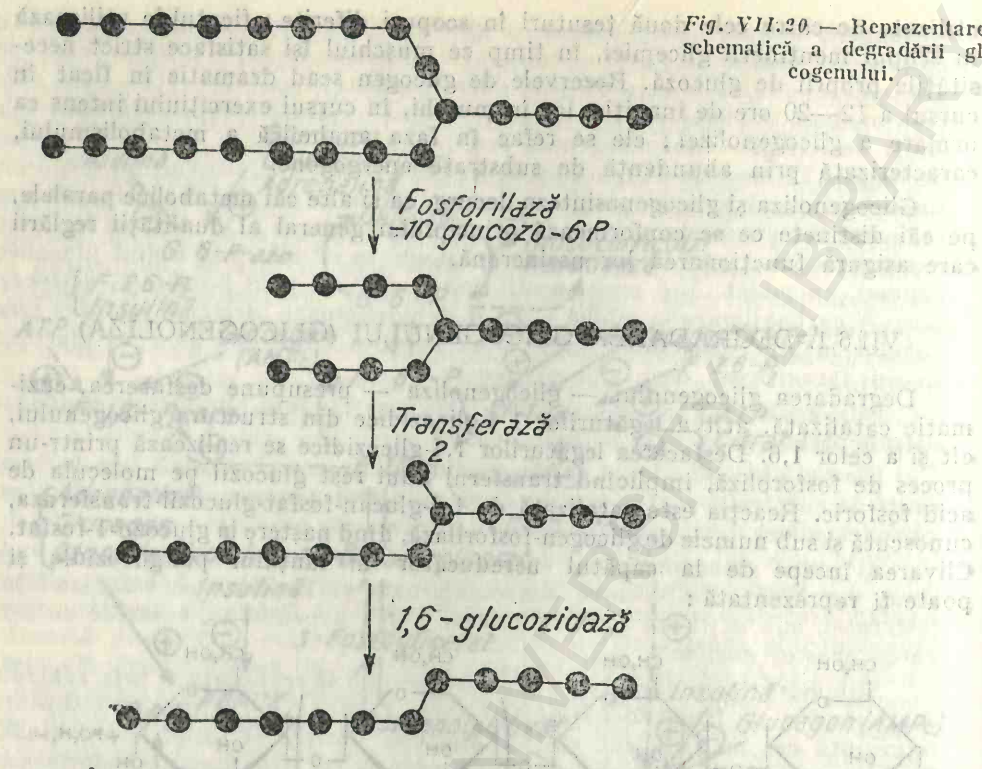
Degradarea glicogenului — glicogenoliza — presupune desfacerea, enzimatic catalizată, atât a legăturilor 1,4-glicozidice din structura glicogenului, cât și a celor 1,6. Desfacerea legăturilor 1,4-glicozidice se realizează printr-un proces de fosforoliză, implicând transferul unui rest glucozil pe molecula de acid fosforic. Reacția este catalizată de 1,4-glucan-fosfat-glucozil-transferaza, cunoscută și sub numele de glicogen-fosforilază, dând naștere la glucozo-1-fosfat. Clivarea începe de la capătul nereducător al lanțului poliglicozidic și poate fi reprezentată :



Fosforilaza nu poate să desfacă legăturile 1,6-glicozidice din molecula glicogenului, acțiunea sa încetînd la o distanță de patru resturi glucozil față de o ramificație 1,6. O altă enzimă, enzima de deramifiere avînd activitate amilo-1,4-1,6-glucan transferazică, catalizează transferul unei unități trizaharidice de pe un lanț pe un altul. În regiunea de ramificație rămîne un singur rest glucozil care va fi hidrolizat ulterior de aceeași enzimă de deramifiere (enzimă bifuncțională) care manifestă și activitate 1,6-glucozidazică (fig. VII.20). După degradarea lanțului lateral, fosforilaza își continuă nestingerită acțiunea pînă în apropierea unui nou punct de ramificație.

Ca urmare a glicogenolizei rezultă glucozo-1-fosfat și mici cantități de glucoză (prin acțiunea 1,6-glucozidazei). Glucozo-1-fosfatul este convertit la glucozo-6-fosfat sub acțiunea glucomutazei, enzimă necesitînd drept cofactor ionul de  $Mg^{2+}$ .

Fig. VII.20. — Reprezentarea schematică a degradării glicogenului.



În ficat, glucozo-6-fosfatul este hidrolizat, sub acțiunea glucozo-6-fosfatazei, la glucoză, care va fi trimisă în circulație în scopul satisfacerii nevoilor energetice ale țesuturilor glucodependente.

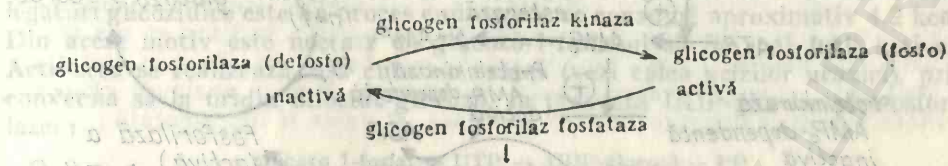
În mușchi, țesut lipsit de glucozo-6-fosfatază, glucozo-6-fosfatul va urma calea Embden-Meyerhof, servind ca sursă de energie pentru mușchiul însuși. Scopul glicogenolizei hepatice este deci complet diferit de cel al glicogenolizei musculare. În ficat, intrarea glucozo-6-fosfatului în glicoliză este exclusă în faza catabolică a metabolismului, întrucât în această situație glucagonul (hormonul fazei catabolice) inhibă glicoliza prin scăderea concentrației de fructozo-2,6, bisfosfat, activator al fosfo-fructo-1-kinazei și inactivarea piruvat-kinazei, pe care o convertește la forma fosfo-inactivă.

#### VII.6.1.1. Reglarea glicogenolizei

Eta limitantă de viteză în degradarea glicogenului este etapa fosforolitică. Enzima ce catalizează reacția de fosforoliză — glicogen fosforilaza — este subordonată unui control metabolic variat și complex, realizat atât prin reglare covalentă cit și alosterică. Ca activator alosteric al enzimei se comportă AMP în timp ce glucozo-6-fosfatul și ATP (concentrații mari) sînt inhibitori alosterici ai enzimei.



Experiențele lui Cori au arătat că fosforilaza se găsește în țesuturi în două forme interconvertibile prin fosforilare-defosforilare. Interconversia celor două forme ale glicogen-fosforilazei se realizează grație acțiunii antagoniste a două enzime : glicogen fosforilaz-kinaza și glicogen fosforilaz-fosfataza și poate fi reprezentată :



Glicogen fosforilaz kinaza este o enzimă constituită din 4 tipuri de subunități fiecare prezentă în 4 copii. Subunitatea  $\gamma$  funcționează ca subunitate catalitică în timp ce subunitățile  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  îndeplinesc roluri reglatorii. Subunitatea  $\gamma$  este reprezentată de calmodulină, proteină care fixează calciul și care funcționează de concentrația citoplasmatică a acestuia își modifică conformația.

Fosforilaz kinaza este ea însăși prezentă în două forme interconvertibile. Conversia fosforilaz-kinazei inactive la formă activă se realizează tot prin fosforilare realizată la subunitățile  $\alpha$  și  $\beta$  în prezența ATP și a unei kinaze, protein kinaza  $\text{AMP}_c$  dependentă. Forma fosfo-activă a fosforilaz kinazei este reconvertită la formă defosfo inactivă, sub acțiunea unei fosfataze (fosfo-protein fosfataza), identică cu glicogen fosforilaz fosfataza.  $\text{AMP}_c$ , mesagerul secund format ca răspuns la acțiunea adrenalinei în ficat și mușchi (acțiune mediată prin  $\beta$  receptori) și a glucagonului în ficat, stimulează activitatea kinazei  $\text{AMP}_c$  dependente, care va efectua fosforilarea fosforilaz kinazei. Fosforilaz-kinaza astfel activată va cataliza fosforilarea glicogen fosforilazei care, activându-se, va scinda fosforolitic glicogenul. Viteza de desfășurare a glicogenolizei va crește deci ca urmare a acțiunii adrenalinei și (sau) glucagonului, ale căror efecte intracelulare au fost realizate prin  $\text{AMP}_c$ . De remarcat că activarea „în cascadă” a glicogenolizei realizează o amplificare a răspunsului celulei la stimulul inițial. Într-adevăr, eliberarea unor concentrații mici de adrenalină (de ordinul  $10^{-9}$  M) sau glucagon, determină, printr-o amplificare succesivă în etapele descrise, o amplificare a glicogenolizei de 15 ordine de mărime (fig. VII.21).

Restabilirea valorilor glicemiei deprimă secreția de glucagon. Ca urmare a acestui fapt, proteina G devine inactivă, ceea ce antrenează inactivarea adenilat ciclazei, a protein kinazei  $\text{AMP}_c$  dependente, a fosforilaz kinazei și glicogen fosforilazei.

De menționat că glicogenoliza hepatică este controlată de adrenalină nu numai prin creșterea concentrației  $\text{AMP}_c$ , mesager secund format ca răspuns la interacțiunea hormonului cu  $\beta$ -receptori membranari, ci și prin mesageri secunzi rezultați în urma interacțiunii adrenalinei cu receptori adrenergici de tip  $\alpha_1$ . Această interacțiune se soldează cu formarea a doi mesageri secunzi : inozitol trisfosfatul ( $\text{IP}_3$ ) și diacilglicerolul (DAG) (vezi „Hormoni”).  $\text{IP}_3$  scoate calciul din reticulul endoplasmic crescând astfel concentrația sa citozolică. Unitatea  $\delta$  a glicogen fosforilaz kinazei, reprezentată de calmo-

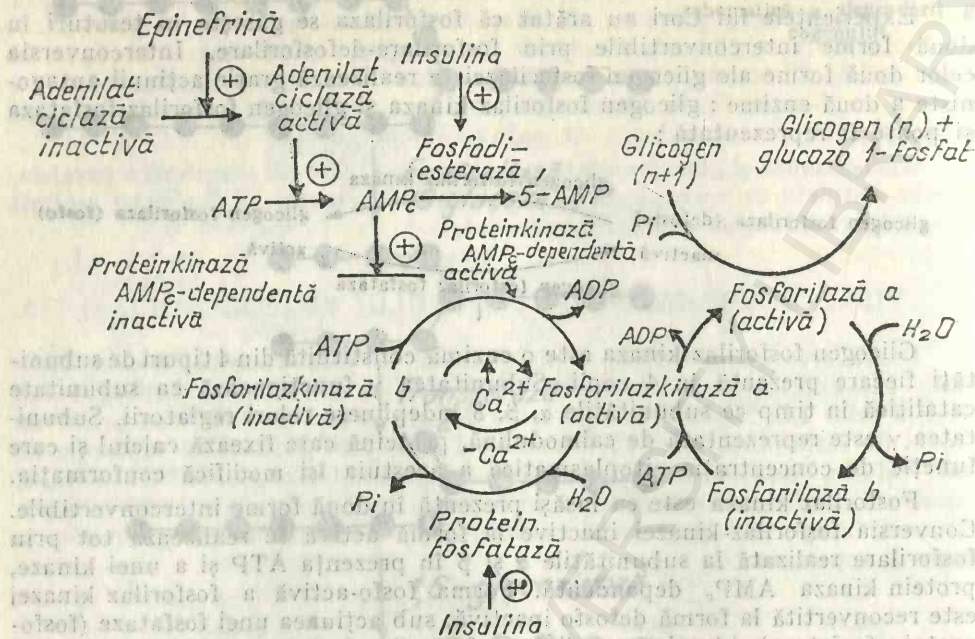


Fig. VII.21 — Controlul glicogenolizei.

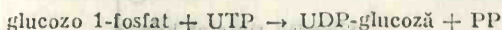
dulină, leagă cu afinitate mare calciul, ceea ce induce în molecula enzimei o tranziție conformațională avînd ca rezultat superactivarea acesteia. Activarea la maximum a glicogenolizei hepatice în condiții de stress permite restabilirea rapidă a glicemiei.

Glicogenoliza musculară este declanșată, așa cum s-a menționat, de acțiunea adrenalinei mediată de receptori  $\beta$  adrenergici. Ca și glicogenoliza hepatică glicogenoliza musculară este exacerbată de creșterea calciului citosolic, creștere determinată însă în mușchi de acetilcolină. Acetilcolina care mediază transferul influxului nervos se adresează receptorilor adrenergici de tip  $\alpha_1$  și determină via  $IP_3$  (ca și adrenalina în ficat) mobilizarea calciului din reticulul sarcoplasmic. Calciu necesar contracției musculare de necesitatea căruia mușchiul este informat prin acetilcolină determină superactivarea glicogen-fosforilaz-kinazei prin legarea la subunitatea  $\delta$ ; deci superactivarea glicogenolizei. Declanșarea prin același stimul ( $Ca^{2+}$ ) atât a contracției cît și a glicogenolizei asigură sincronizarea absolut necesară a celor două procese. Creșterea concentrației  $Ca^{2+}$  citosolic crește activitatea musculară și furnizează în același timp prin superactivarea glicogenolizei cantități mari de glucozo-6-fosfat care prin parcurgerea glicolizei va genera ATP necesar contracției. Intrarea glucozo-6-fosfatului în glicoliză în prezența adrenalinei se datorează existenței în mușchi a 6-fosfofructo-2-kinazei/fructo-2,6-bisfosfatazei care prin fosforilare  $AMP_e$  dependentă devine activă ca 6-fosfofructo-2-kinază și inactivă ca fructo-2,6-bisfosfatază (spre deosebire de enzima hepatică). Creșterea concentrației fructo-2,6-bisfosfatului sub acțiunea adrenalinei duce la activarea fosfofructo-1-kinazei și deci a glicolizei.



## VII.6.2. BIOSINTEZA GLICOGENULUI (GLICOGENOGENEZA)

Biosinteza glicogenului din glucozo 1-fosfat implică acțiunea conjugată a unor enzime apte să realizeze legături 1,4 și 1,6 glicozidice. Formarea unei legături glicozidice este un proces endergonic ce consumă aproximativ 4,2 kcal. Din acest motiv este necesar ca glucozo-1-fosfatul să fie mai întâi activat. Activarea se realizează, așa cum s-a arătat (vezi calea acizilor uronici), prin conversia sa la uridin difosfat glucoză, în prezența UDP-glucozo-pirofosforilazei :



Uridin difosfat glucoza cedează un rest glucozil pe un glicogen „mic” rezultat din glicogenoliză și care servește ca inițiator (primer) al procesului de policondensare. Transferul unității glucozil de pe uridin difosfat glucoză pe primerul glicogenic se efectuează la capătul nereducător al oligozaharidului și este catalizat de glicogen sintetază (fig. VII.22). Energia eliberată la sinteza unei legături 1,4 glicozidice, prin transferul glucozei de pe uridin difosfat glucoză, este de aproximativ 3 kcal, deci reacția este termodinamic avantajoasă sintezei (la hidroliza pirofosfatului  $\Delta G^\circ = -7$  kcal).

Glicogen sintetaza realizează exclusiv legăturile 1,4 din molecula glicogenului. Ramificarea glicogenului se realizează sub acțiunea amilo-1,4-1,6-transglicozidazei (enzima de ramificare) și implică transferul de resturi glucozil (cel puțin șase) la C<sub>6</sub> al unui rest de glucoză din aceeași sau dintr-o altă catenă (fig. VII.23).

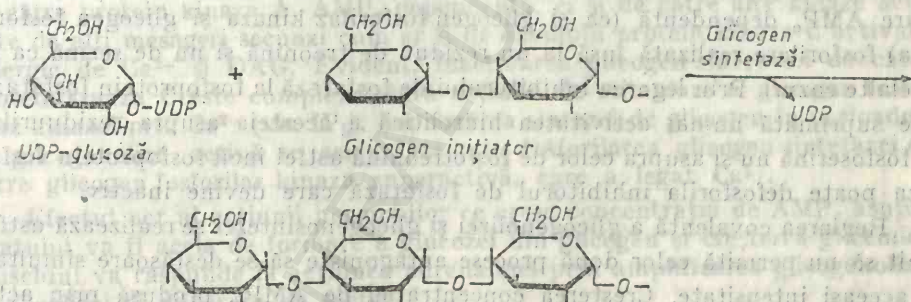


Fig. VII.22 — Sinteza legăturilor 1,4 glicozidice din molecula glicogenului.

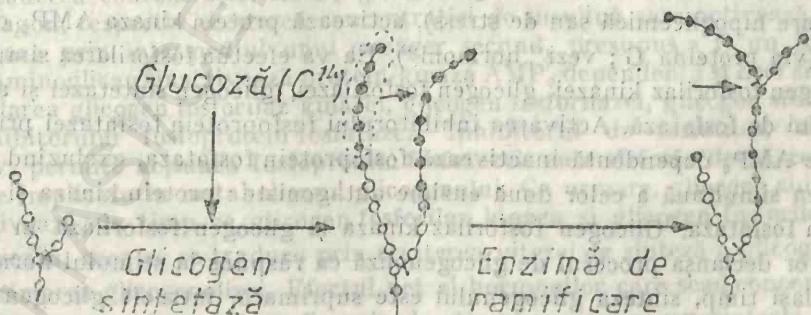
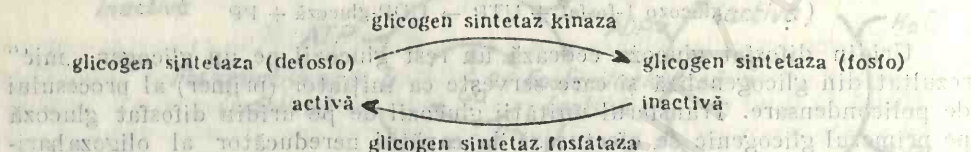


Fig. VII.23 — Reprezentarea schematică a biosintezei glicogenului.

## VII.6.2.1. Reglarea glicogenogenezei

Enzima limitantă de viteză a glicogenosintezei, la nivelul căreia se exercită un control metabolic riguros, este glicogen-sintetaza. Ca și glicogen fosforilaza, glicogen-sintetaza se prezintă sub două forme interconvertibile prin fosforilare-defosforilare. Forma fosforilată este inactivă în timp ce cea defosforilată este activă. Interconversia celor două forme ale glicogen sintetazei se realizează esențial grație acțiunii antagoniste a două enzime: glicogen-sintetaz-kinaza și glicogen-sintetaz-fosfataza, și poate fi reprezentată:



Glicogen sintetaz kinaza este identică cu protein kinaza  $AMP_e$  dependentă, care activează prin fosforilare glicogen fosforilaz kinaza. Glicogen-sintetaz-fosfataza este identică cu glicogen-fosforilaz kinaz fosfataza și cu glicogen fosforilaz fosfataza. Această fosfo-protein fosfatază realizează prin defosforilare activarea glicogen-sintetazei și inactivarea simultană a glicogen fosforilaz kinazei și glicogen fosforilazei.

O măsură adițională pe care o ia celula pentru a evita desfășurarea simultană a defosforilării cu fosforilarea constă în inactivarea fosfo-protein fosfatazei de către o proteină — inhibitorul de fosfatază — care devine activ prin fosforilare  $AMP_e$  dependentă (ca și glicogen fosforilaz kinaza și glicogen fosforilaza) fosforilare realizată însă la un reziduu de treonină și nu de serină ca în celelalte cazuri. Prin legarea inhibitorului de fosfatază la fosfoprotein fosfataza este suprimată numai activitatea hidrolitică a acesteia asupra reziduurilor de fosfoserină nu și asupra celor de fosfotreonină astfel încît fosfoprotein fosfataza poate defosforila inhibitorul de fosfatază care devine inactiv.

Reglarea covalentă a glicogenolizei și glicogenosintezei se realizează astfel încît să nu permită celor două procese antagoniste să se desfășoare simultan la aceeași intensitate. Creșterea concentrației de  $AMP_e$ , produsă prin activarea adenilat-ciclazei de către glucagon și adrenalină (secretați ca răspuns la o stare hipoglicemică sau de stress), activează protein kinaza  $AMP_e$  dependentă (via proteina G; vezi „hormoni“). Ea va efectua fosforilarea simultană a glicogen fosforilaz kinazei, glicogen fosforilazei, glicogen sintetazei și a inhibitorului de fosfatază. Activarea inhibitorului fosfoprotein fosfatazei prin fosforilare  $AMP_e$  dependentă inactivează fosfoprotein fosfataza, excluzînd funcționarea simultană a celor două enzime antagoniste: protein kinaza și fosfo-protein fosfataza. Glicogen fosforilaz kinaza și glicogen fosforilaza în formă fosfo vor declanșa procesul de glicogenoliză ca răspuns la stimulul hormonal. În același timp, sinteza glicogenului este suprimată, întrucît glicogen sintetaza se inactivează prin fosforilare (fig. VII.24).



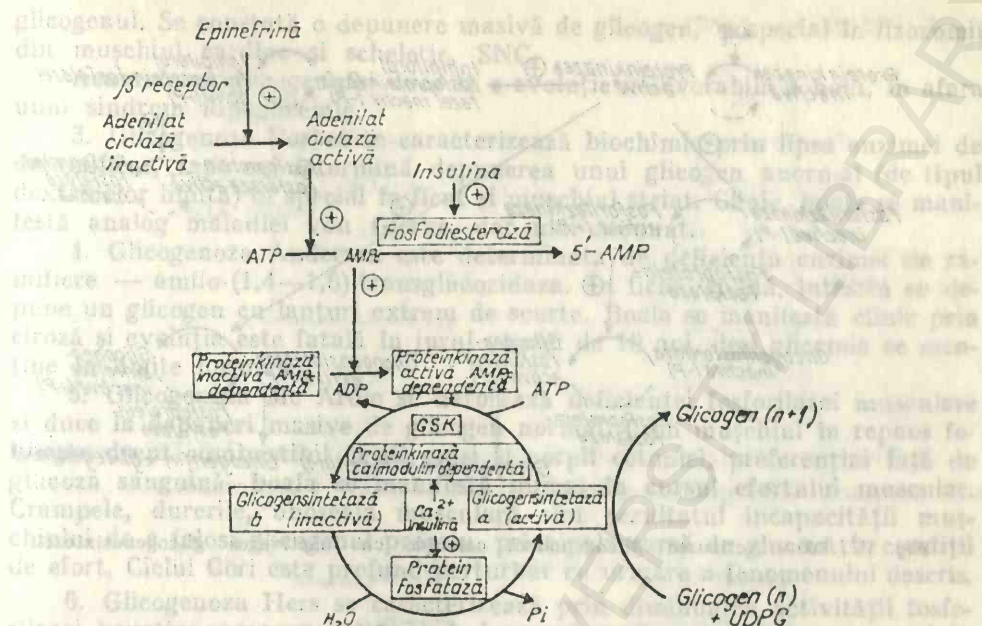


Fig. VII.21 — Controlul sintezei glicogenului.

De menționat că glicogen-sintetaza este inhibată prin fosforilare nu numai de către protein kinaza A, AMP<sub>c</sub> dependentă, ci și de către alte kinaze activate de alți mesageri secunzi cum ar fi de exemplu protein kinaza C activată sinergic de  $\text{Ca}^{2+}$  și DAG. Evident, inactivarea glicogen sintetazei de către protein kinaza C este complementară acțiunii de stimulare a glicogen fosforilaz kinazei prin  $\text{Ca}^{2+}$  (via  $\text{IP}_3$ ). Suprimarea sintezei de glicogen în perioadele de glicogenoliză activă se asigură și prin fosforilarea glicogen sintetazei de către glicogen fosforilaz kinaza superactivă, care a legat  $\text{Ca}^{2+}$ .

Efectul net al acțiunii hormonilor ce cresc concentrația de AMP<sub>c</sub> asupra ficatului va fi acela de formare a glucozei din glicogen și creșterea glicemiei. Mușchiul va răspunde la acțiunea adrenalinei prin amplificarea glicogenolizei și glicolizei și eliberare de lactat.

Scăderea concentrației AMP<sub>c</sub> (prin scăderea concentrației de adrenalină și glucagon, respectiv creșterea concentrației de insulină care activează fosfodiesteraza prin intermediul unui mesager secund, presupus a fi un inozitol glicozaminoglican) inactivează protein-kinaza AMP<sub>c</sub> dependentă și deci sistează fosforilarea glicogen fosforilaz kinazei, glicogen fosforilazei, glicogen sintetazei și inhibitorului fosfoprotein fosfatazei. Inhibitorul de fosfatază, devenit inactiv, permite acțiunea fosfoprotein fosfatazei, care defosforilează cele trei enzime implicate în metabolismul glicogenului. Ca urmare, glicogen sintetaza se activează, în timp ce glicogen fosforilaz kinaza și glicogen fosforilaza se inactivează, ceea ce se traduce prin creșterea vitezei de sinteză a glicogenului și deprimarea glicogenolizei. Efectul net al hormonilor care scad concentrația de AMP<sub>c</sub> asupra ficatului va fi acela de stimulare a glicogenosintezei și deci de scădere a glicemiei (fig. VII.25).

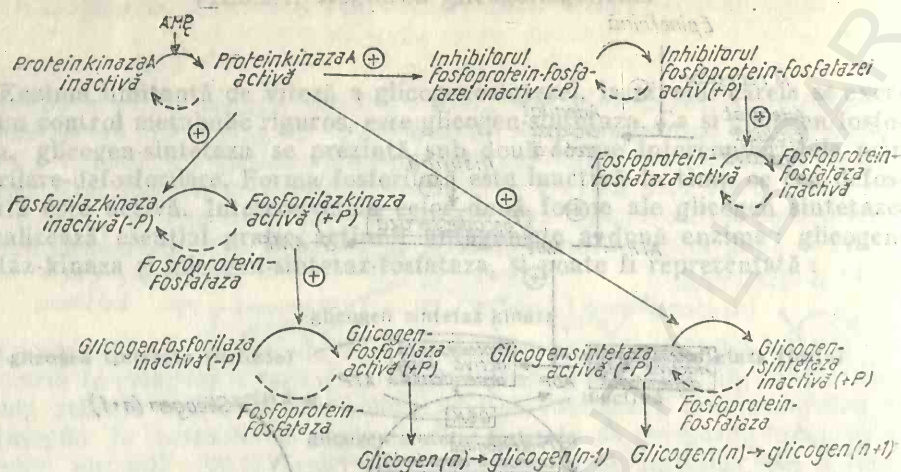


Fig. VII.25 — Activarea glicogenolizei coincide cu inactivarea glicogenosintezei.

### VII.6.3. ALTERĂRI ENZIMATICE ÎN METABOLISMUL GLICOGENULUI

Se cunosc numeroase situații patologice caracterizate prin deficiența ereditară a sistemelor enzimatice implicate în metabolismul glicogenului. Aceste deficiențe antrenează depunerea unor cantități masive de glicogen și din acest motiv au fost reunite sub numele de boli de depozitare a glicogenului sau glicogenoze. Au fost descrise pînă acum două tipuri de glicogenoze.

1. Glicogenoza hepato-renală sau boala von Gierke reprezintă cel mai frecvent tip de glicogenoză. Boala se caracterizează printr-o activitate redusă sau prin absența glucozo-6-fosfatazei în ficat, intestin, rinichi (singurele țesuturi care conțin enzima), ceea ce are ca rezultat imobilizarea glucozei. Hipoglicemia marcată care se instalează nu poate fi corectată prin administrare de glucagon sau adrenalină. Stigmatele biochimice sînt cele ce însoțesc în general hipoglicemia. Alarmarea sistemelor hiperglicemiant antrenează mobilizarea excesivă a lipidelor și proteinelor din țesuturile extrahepatice și creșterea gluconeogenezei. Cetogeneza excesivă și lactacidemia completează tabloul biochimic al bolii.

Manifestările clinice ale bolii sînt: tulburări digestive, convulsii, hepatomegalie (prin depozitarea glicogenului și încărcare lipidică), manifestări neurologice.

Boala apare încă din primele luni de viață și are adesea o evoluție fatală. Depășirea primei etape și corectarea hipercorticismului duce la o evoluție relativ normală în cadrul hipoglicemiei persistente.

2. Glicogenoza generalizată sau sindromul Pompe se datorează deficienței de (1,4—1,6) glucozidază, enzimă lizozomală avînd rolul de a degrada



glicogenul. Se constată o depunere masivă de glicogen, în special în lizozomii din mușchiul cardiac și scheletic, SNC.

Acumularea glicogenului duce la o evoluție nefavorabilă a bolii, în afara unui sindrom hipoglicemic.

3. Glicogenoza Forbes se caracterizează biochimic prin lipsa enzimei de deramifiere, fapt ce determină depunerea unui glicogen anormal (de tipul dextrinelor limită) în special în ficat și mușchiul striat. Clinic, boala se manifestă analog maladiei von Gierke, dar mai atenuat.

4. Glicogenoza Andersen este determinată de deficiența enzimei de ramifiere — amilo-(1,4—1,6)-transglucozidaza. În ficat, splină, intestin se depune un glicogen cu lanțuri extrem de scurte. Boala se manifestă clinic prin ciroză și evoluția este fatală în jurul vârstei de 10 ani, deși glicemia se menține în limite normale.

5. Glicogenoza Mc Ardle se datorează deficienței fosforilazei musculare și duce la depuneri masive de glicogen normal. Cum mușchiul în repaos folosește drept combustibil acizii grași și corpii cetonici, preferențial față de glucoza sanguină, boala se manifestă numai în cursul efortului muscular. Crampele, durerile, oboseala musculară sînt rezultatul incapacității mușchiului de a folosi glicogenul propriu, principala sursă de glucoză în condiții de efort. Ciclul Cori este profund perturbat ca urmare a fenomenului descris.

6. Glicogenoza Hers se caracterizează prin diminuarea activității fosforilazei hepatice, ceea ce antrenează depuneri masive de glicogen normal în ficat. Hipoglicemia nu este foarte severă. Maladia Hers se manifestă de asemenea ca o formă atenuată a maladiei von Gierke. Unii autori consideră drept cauză primară a acestui tip de glicogenoză o anomalie în activitatea adenilat ciclazei, incapabilă să asigure o concentrație adecvată de AMP.

7. Glicogenoza de tip 7 reprezintă forma maladiei Hers în care, concomitent cu depozitarea excesivă de glicogen în ficat, se constată și o încălcare musculară.

8. A fost descrisă o glicogenoză de tip 8, avînd drept cauză absența glucagonului, activator al fosforilazei.

9. Hug a pus în evidență glicogenoze datorate deficitului unor sisteme enzimatice responsabile de activarea fosforilazei, cum ar fi fosforilaz-kinaza (glicogenoza de tip 9).

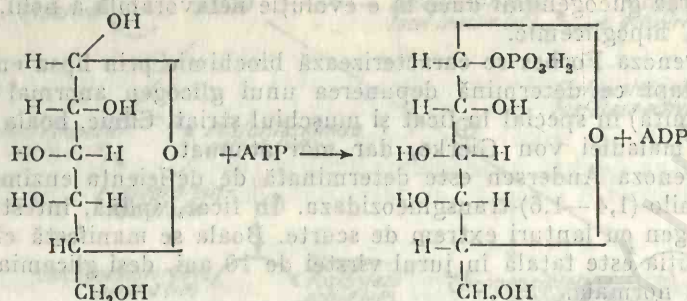
Există posibilitatea ca unele tipuri de glicogenoze să apară asociate, ceea ce complică diagnosticarea și tratamentul acestora.

## VII.7. METABOLISMUL GALACTOZEI

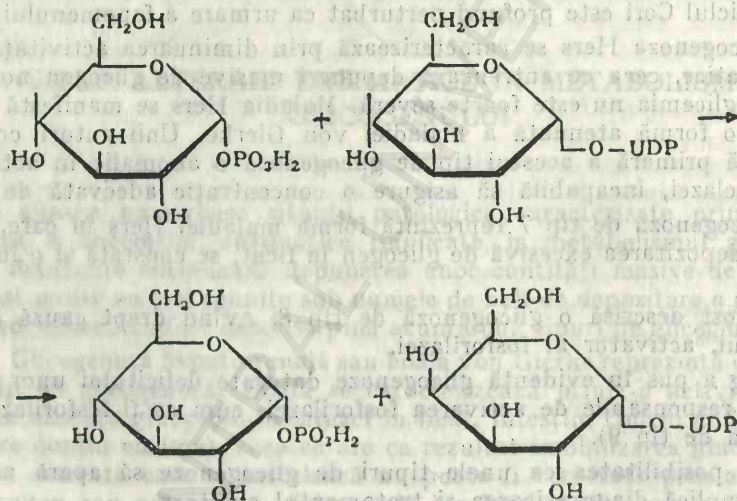
Galactoza este o componentă majoră a glicolipidelor, glicoproteinelor, proteoglicanilor. Metabolismul său parcurge căile de edificare a acestor componente. Pe de altă parte, galactoza este convertită la glucoză, cu precădere în rinichi și ficat, astfel încît căile sale de metabolism sînt comune cu ale acesteia.

Conversia galactozei la glucoză parcurge etapele:

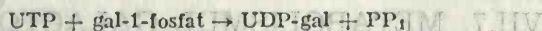
## 1. fosforilarea galactozei :



2. Transferul restului galactozil pe uridin difosfat-glucoză (UDP-glucoză), sub acțiunea UDP-glucozo-galactozo-1-fosfat-uridil transferazei :



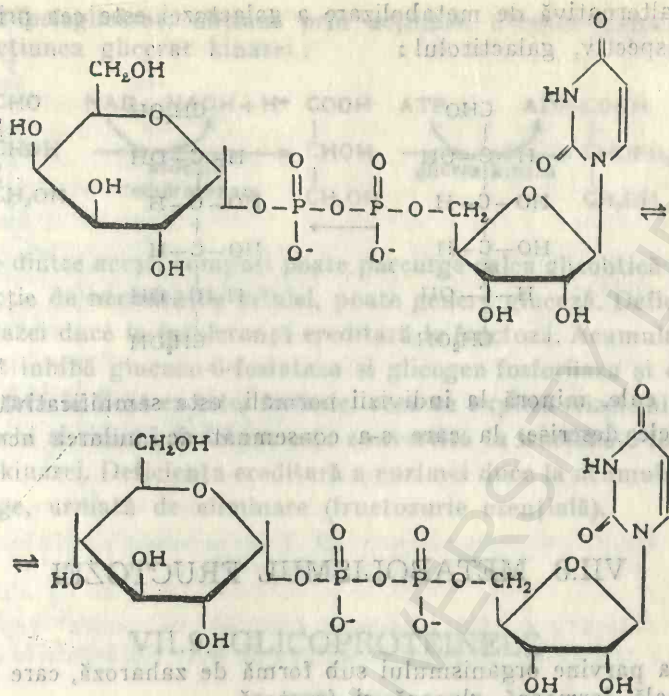
UDP-galactoză se formează parțial și prin reacția :



Activitatea UDP-galactozo-pirofosforilazei, enzima ce catalizează reacția de mai sus, scade cu vîrsta, astfel încît ea nu se poate substitui UDP-glucozo-galactozo-1-fosfat uridil transferazei.

3. Interconversia celor două oze se produce la nivelul nucleozid-difosfaților și presupune inversia grupei -OH de la C<sub>4</sub> (epimerizare la C<sub>4</sub>). Reacția este catalizată de o epimerază :



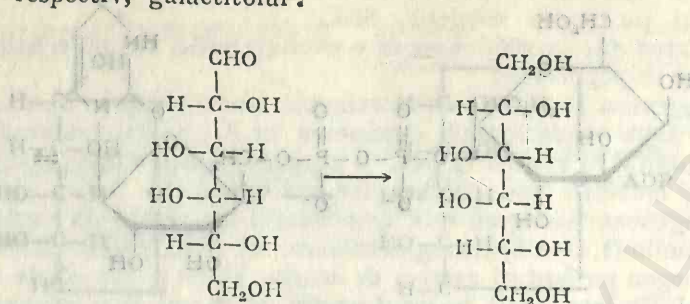


Echilibrul  $\text{UDP-Gal} \rightleftharpoons \text{UDP-Gluc}$  este dominat de nevoile organismului la un moment dat. În perioadele de lactație, când glanda mamară sintetizează mari cantități de lactoză, în perioadele de formare a structurilor glicolipidice (mielină), echilibrul este favorabil formării galactozei. Interconversia  $\text{UDP-Gal} \rightleftharpoons \text{UDP-Gluc}$  face ca prezența galactozei să nu fie obligatorie în dietă.

UDP-glucosa poate constitui precursorul imediat al sintezei de glicogen sau poate fi scindată la glucozo-1-fosfat ( $\text{UDP-Gluc} + \text{PP} \rightarrow \text{UTP} + \text{Gluc-1-fosfat}$ ).

Metabolismul galactozei poate fi blocat în anomalia genetică a enzimelor implicate în conversia sa la glucoză. Deficiența galactokinazei duce la galactozemie și galactozurie și se manifestă clinic prin apariția cataractei (ca urmare a reducerii galactozei la galactitol). Mult mai severă este deficiența UDP-glucozo-galactozo-1-fosfat uridil transferazei, întrucât acumularea de galactozo-1-fosfat în ficat duce la sechestrarea fosfatului sub forma acestui ester. Stigmatul clinic al bolii sînt: alterări hepatice, cataractă, tulburări neuropsihice. Modificări analoge pot apărea în insuficiența hepatică gravă, când ficatul este incapabil să metabolizeze galactoză (toleranța la galactoză exprimă starea hepatocitului). Din acest motiv, diagnosticul diferențial implică cu necesitate evaluarea activității UDP-glucozo-galactozo-1-fosfat uridil-transferazei. Eliminarea din dietă a galactozei se impune în ambele situații.

O cale alternativă de metabolizare a galactozei este cea prin formarea polioliului respectiv, galactitolul :

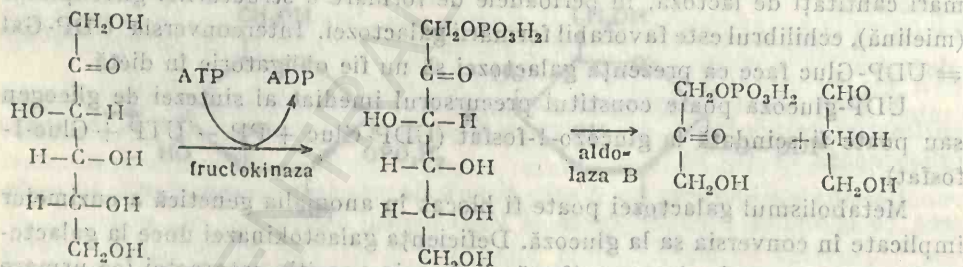


Această cale, minoră la indivizii normali, este semnificativă la indivizi cu deficiențele descrise, la care s-a consemnat acumularea acestui polioli.

## VII.8. METABOLISMUL FRUCTOZEI

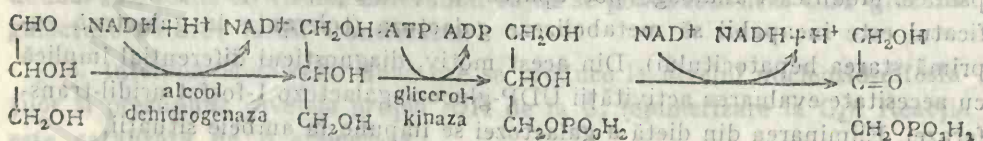
Fructoza parvine organismului sub formă de zaharoză, care prin hidroliză intestinală formează glucoză și fructoză.

În organism, fructoza este convertită la glucoză. Prima etapă în metabolizarea fructozei constă în fosforilarea sa sub acțiunea fructokinazei. Fructozo-1-fosfatul rezultat este scindat sub acțiunea aldolazei B, enzima prezentă exclusiv în ficat, în două trioze: gliceraldehidă și dihidroxiaceton-fosfat:



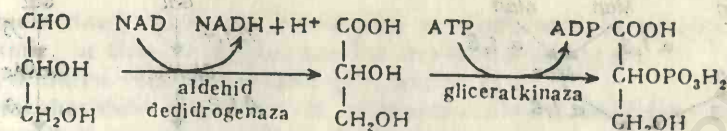
Gliceraldehida formată intră în glicoliză pe următoarele căi :

- prin fosforilare la gliceraldehid-3-fosfat, sub acțiunea unei triozkinaze;
- ca dihidroxiaceton-fosfat, obținut prin următoarea succesiune de reacții :





c. ca 2-fosfoglicerat, obținut prin acțiunea aldehyd dehidrogenazei urmată de acțiunea glicerat kinazei :



Oricare dintre acești compuși poate parcurge calea glicolitică spre piruvat sau, în funcție de necesitățile celulei, poate genera glucoză. Deficiența ereditară a aldolazei duce la intoleranță ereditară la fructoză. Acumularea de fructozo-1-fosfat inhibă glucozo-6-fosfataza și glicogen fosforilaza și deci glucoza este sechestrată în ficat ca ester fosforic, ceea ce explică crizele hipoglicemice.

În mușchi și rinichi, fructoza este convertită la fructozo-6-fosfat sub acțiunea hexokinazei. Deficiența ereditară a enzimei duce la acumularea de fructoză în sânge, urmată de eliminare (fructozurie esențială).

## VII.9. GLICOPROTEINELE

Glicoproteinele reprezintă o clasă de proteine rezultate prin legarea covalentă la lanțurile polipeptidice a unor fragmente oligozaharidice liniare sau ramificate, de dimensiuni variabile. Conținutul glucidic al glicoproteinelor variază între 1 și 60—80% din masa moleculei.

Monozaharidele care intră în structura glicoproteinelor sînt esențial galactoză, manoză, fucoză, acidul sialic, galactozamina, glucozamina, arabinoză și xiloza. Numărul de rezidii monozaharidice în fragmentele oligozaharidice variază între minimum 3 și maximum 15.

Legăturile dintre fragmentele oligozaharidice și proteine sînt legături de tip N- sau O-glicozidice și se stabilesc fie prin azotul amidic al asparaginei, fie prin grupările hidroxil ale serinei, treoninei, hidroxilisinei, hidroxiprolinei.

La formarea legăturii N- sau O-glicozidice participă cu precădere N-acetil-glucozamina și N-acetil-galactozamina. Cealaltă extremitate a lanțului oligozaharidic este reprezentată în special de acidul sialic. Legătura N-glicozidică este cea mai frecventă și utilizează ca monozaharid de legătură N-acetil-glucozamina (NAc Glc).

Există două tipuri principale de oligozaharide N-glicozidice :

— simple — conținând exclusiv N-acetil-glucozamină (NAc Glc) și un număr relativ mare de unități manozil ;

— complexe — care pe lângă N-acetil-glucozamină și manoză conțin acid sialic, galactoză, N-acetil-galactozamină (NAc Gal).

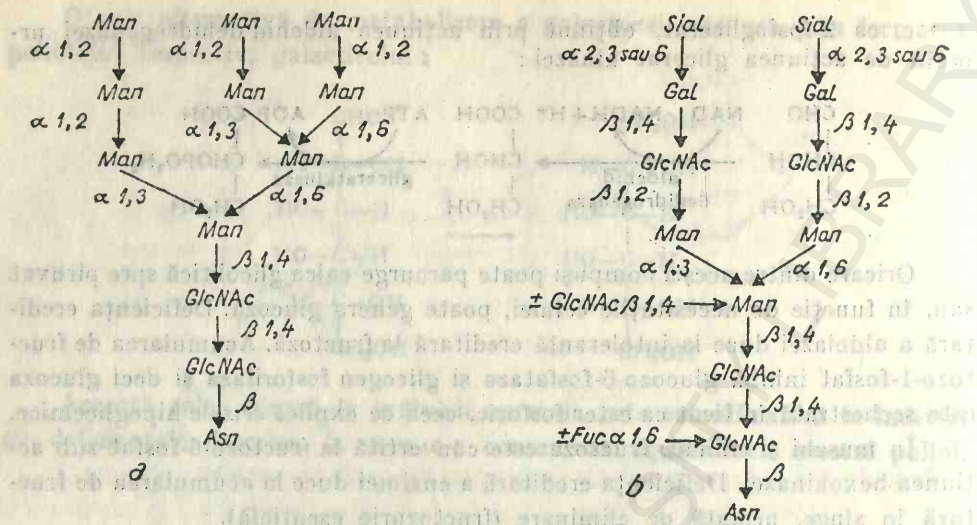
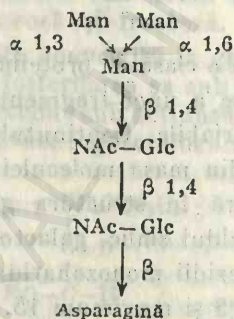


Fig. VII.26 — Structura unui oligozaharid simplu, bogat în manoză (a), și a unui oligozaharid complex (b).

Ambele categorii conțin o regiune comună, un „miez“ reprezentat de succesiunea a trei resturi de manoză și două de NAc Glc legate la asparagină :



În timp ce în oligozaharidele simple, bogate în manoză, ramificațiile sînt constituite dintr-un număr variabil de unități manozil, în cele complexe ramificațiile externe constau, cel mai adesea, din unitatea trizaharidică, sialic-galactoză-N acetilglucozamină. Un rest fucosil se leagă uneori la restul N-acetilglucozamină din „miezul“ oligozaharidic. În fig. VII.26 este reprezentată structura unui oligozaharid simplu, bogat în manoză (izolat din tireoglobulina bovină), și a unui oligozaharid complex.

## VII.9.1. BIOSINTEZA GLICOPROTEINELOR

Biosinteza glicoproteinelor presupune următoarele etape :

1. formarea unui oligozaharid precursor ;
2. transferul oligozaharidului pe proteina acceptoare ;



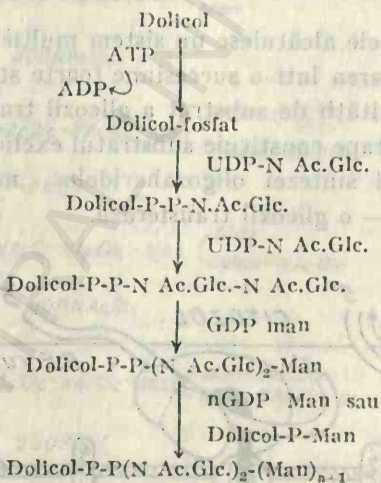
3. prelucrarea oligozaharidului precursor din molecula glicoproteinelor, cu formarea glicoproteinelor „mature“, conținând un fragment oligozaharidic specific.

Primele două etape ale biosintezei se desfășoară la nivelul reticulului endoplasmic, în timp ce ultima are loc în complexul Golgi.

#### 1. Formarea oligozaharidului precursor.

Monozaharidele iau parte la biosinteza oligozaharidelor, atât a celui precursor, cât și a celor „mature“, în stare activată. Ca și în cazul biosintezei glicogenului, forma activă este reprezentată de nucleozid-difosfat-monozaharid. Monozaharidele arată oarecare specificitate față de nucleozid-trifosfatul cu care reacționează. Astfel,  $\alpha$ -glucoza și  $\alpha$ -galactoza, ca și N-acetil-ozaminele corespunzătoare, se leagă de CMP. Oligozaharidul precursor este un oligozaharid simplu (conținând exclusiv N-acetil-glucozamină și manoză) ce rezultă prin transferul succesiv al ozelor activate pe un alcool gras care poartă numele de dolicol. Molecula de dolicol, care este un poliizoprenol, este puternic hidrofobă și are o lungime de aproximativ 10 nm, ceea ce-i permite să străbată de mai multe ori dublul strat lipidic al membranei reticulului endoplasmic (fața luminală) în care este ancorat.

Dolicolul este fosforilat în prezența ATP formînd dolicol fosfat care devine acceptorul resturilor glicozidice ce constituie „miezul“ precursor. La „miezul“ comun se adaugă un număr variabil de unități manozil cedate fie de GDP-manoză, fie de dolicol-fosfat-manoză. Se edifică astfel oligozaharidul precursor, avînd structura oligozaharidelor simple, bogate în manoză:



De remarcă că oligozaharidul se leagă de dolicol printr-o legătură pirofosfat care îl activează, facilitînd transferul său ulterior pe proteină. Proteinele ce urmează a fi glicozilate pentru a da naștere glicoproteinelor sînt sintetizate, ca toate proteinele secretorii, pe ribozomii ancorați pe reticulul endoplasmic (RE). Ancorarea la un moment dat a unui ribozom implicat în sinteza unei proteine secretorii pe reticulul endoplasmic este decisă de prezența la capătul aminoterminal al acesteia a unei secvențe semnal, complementară unui domeniu din molecula riboforinelor, proteine transmembranare ale reticulului endoplasmic. Proteinele sintetizate pe polizomii atașați străbat tunelul subunității

mari a ribozomului, tunel ce se extinde în membrana reticulului endoplasmic. Lanțul polipeptidic își continuă creșterea în reticulul endoplasmic după excizia secvenței semnal sub acțiunea unei peptidaze specifice.

2. Transferul oligozaharidului precursor pe restul asparagină al proteinei este catalizat de o oligozaharid transferază, enzimă membranară avînd centrul activ orientat spre fața luminală a membranei reticulului endoplasmic, acolo unde are loc glicozilarea (fig. VII.27). Această orientare spațială a enzimei de transfer face ca glicozilarea să fie atributul exclusiv al proteinelor ce intră în lumenul reticulului endoplasmic, respectiv al proteinelor de export și al celor destinate a fi proteine ale membranelor intracelulare (lizozomale, nucleare, ale reticulului endoplasmic) și plasmatic. Glicozilarea se efectuează numai pe rezidii de asparagină integrate secvențelor Asn-Aa-Ser sau Asn-Aa-Threo, secvențe rar întîlnite în glicoproteine, tocmai pentru a se evita glicozilări multiple care ar crea dificultăți în organizarea spațială a proteinelor.

3. Prelucrarea glicoproteinelor purtătoare ale unui oligozaharid precursor constă în remodelarea acestuia cu formarea oligozaharidelor complexe. Acest proces decurge în complexul Golgi unde glicoproteinele „imature“ sînt aduse de către microveziculele ce se detașează din capetele reticulului endoplasmic. Prelucrarea oligozaharidului presupune înlăturarea unor resturi glicozil și adăugarea altora, operație efectuată de glicozidaze (esențial manozidaze) și glicozil transferaze (galactozil transferaze, fucozil transferaze, sialil transferaze).

Glicozil-transferazele alcătuiesc un sistem multienzimatic cu determinare spațială rigidă. Adăugarea într-o succesiune foarte strictă a unităților glicozil este rezultatul specificității de substrat a glicozil transferazelor; produsul de glicozilare al fiecărei etape constituie substratul exclusiv al următoarei enzime din sistem. Principiul sintezei oligozaharidelor „mature“ corespunde deci aserțiunii o legătură — o glicozil transferază.

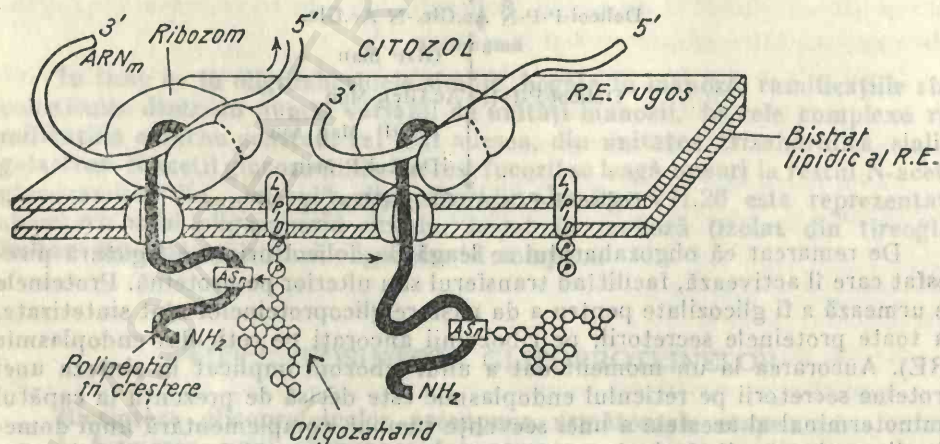


Fig. VII.27 — Glicozilarea unei proteine născîndu-se în lumenul reticulului endoplasmic.



În fig. VII.28 este reprezentată prelucrarea unui oligozaharid precursor cu formarea unei glicoproteine „mature”. Variabilitatea fragmentului oligozaharidic în diferite glicoproteine „mature” sugerează că celula adoptă un „program de prelucrare” diferit al oligozaharidului precursor, în general același, funcție de lanțul polipeptidic de care este legat. Glicoproteinele „mature” în complexul Golgi sint transportate de pe fața concavă a acestuia spre membranele plasmatică, lizozomale, nucleare, de către veziculele secretorii golgiene (coated vesicles). Orientarea glicoproteinelor spre membranele intracelulare sau spre cea plasmatică este probabil decisă de o unitate monozaharidică variabilă.

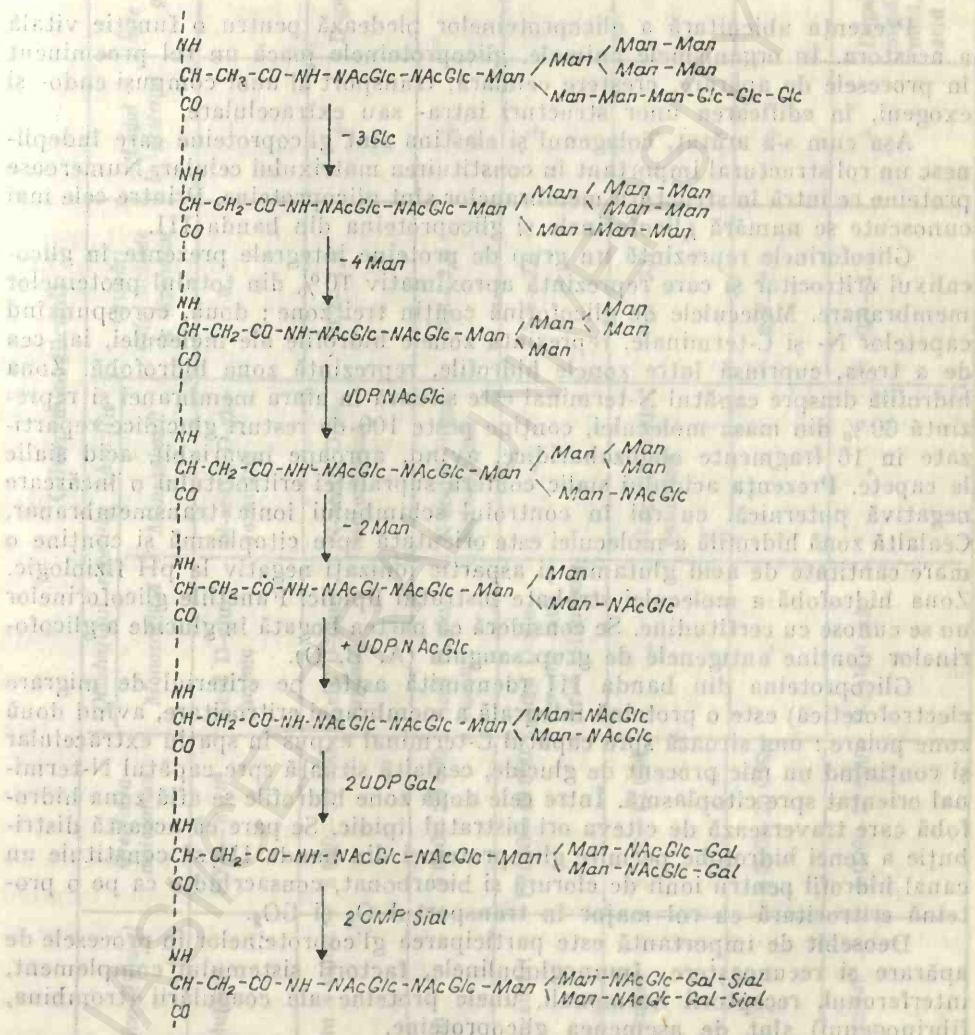


Fig. VII 28 — Prelucrarea oligozaharidului precursor și obținerea glicoproteinei mature.

Fuzionarea veziculelor golgiene cu membrana plasmatică are ca rezultat ancorarea glicoproteinelor pe fața externă a acesteia. Clatrina din veziculele secretorii, proteină organizată structural ca un poliedru, are abilitatea de a integra și transporta componente ale membranei plasmactice spre interiorul celulei, unde vor fi reutilizate la nivelul complexului Golgi, asigurându-se astfel fluxul de membrane între citoplasmă și membrana plasmatică.

## VII.9.2. SEMNIFICAȚIA BIOLOGICĂ A GLICOPROTEINELOR

Prezența ubicuitară a glicoproteinelor pledează pentru o funcție vitală a acestora. În organismele animale, glicoproteinele joacă un rol proeminent în procesele de apărare, creștere celulară, transport al unor compuși endo- și exogeni, în edificarea unor structuri intra- sau extracelulare.

Așa cum s-a arătat, collagenul și elastina sînt glicoproteine care îndeplinesc un rol structural important în constituirea matrixului celular. Numeroase proteine ce intră în structura membranelor sînt glicoproteine. Printre cele mai cunoscute se numără glicoforinele și glicoproteina din banda III.

Glicoforinele reprezintă un grup de proteine integrale prezente în glicocalixul eritocitar și care reprezintă aproximativ 10% din totalul proteinelor membranare. Moleculele de glicoforină conțin trei zone; două, corespunzînd capetelor N- și C-terminale, reprezintă zonele hidrofile ale moleculei, iar cea de a treia, cuprinsă între zonele hidrofile, reprezintă zona hidrofobă. Zona hidrofilă dinspre capătul N-terminal este situată în afara membranei și reprezintă 60% din masa moleculei, conține peste 100 de resturi glucidice repartizate în 16 fragmente oligozaharidice, avînd, aproape invariabil, acid sialic la capete. Prezența acidului sialic conferă suprafeței eritrocitului o încărcare negativă puternică, cu rol în controlul schimbului ionic transmembranar. Cealaltă zonă hidrofilă a moleculei este orientată spre citoplasmă și conține o mare cantitate de acid glutamic și aspartic ionizați negativ la pH fiziologic. Zona hidrofobă a moleculei străbate bistratul lipidic. Funcțiile glicoforinelor nu se cunosc cu certitudine. Se consideră că partea bogată în glucide a glicoforinelor conține antigenele de grup sanguin (A, B, O).

Glicoproteina din banda III (denumită astfel pe criteriul de migrare electroforetică) este o proteină integrală a membranei eritocitare, avînd două zone polare: una situată spre capătul C-terminal expus în spațiu extracelular și conținînd un mic procent de glucide, cealaltă situată spre capătul N-terminal orientat spre citoplasmă. Între cele două zone hidrofile se află zona hidrofobă care traversează de cîteva ori bistratul lipidic. Se pare că această distribuție a zonei hidrofobe permite glicoproteinei din banda III să constituie un canal hidrofil pentru ioni de clorură și bicarbonat, consacînd-o ca pe o proteină eritocitară cu rol major în transportul  $O_2$  și  $CO_2$ .

Deosebit de importantă este participarea glicoproteinelor în procesele de apărare și recunoaștere. Imunoglobulinele, factorii sistemului complement, interferonul, receptorii hormonal, unele proteine ale coagulării (trombina, fibrinogenul) sînt de asemenea glicoproteine.

Recunoașterea celulă-celulă, bacterie-celulă, virus-celulă este mediată de glicoproteine. Una dintre aceste glicoproteine, care a suscitât un interes



Tabel 11.1

## Glicozaminoglicanii

Glicozamino-glicanul	Greutatea moleculară	Dizaharidul repetitiv (A-B) <sub>n</sub>		Grupări sufar/unitate de dizaharid	Legat la proteină	Alte componente glucidice	Distributia tisulară
		Monozaharid	Monozaharid				
Acid hialuronic	4 000—8·10 <sup>6</sup>		Acid D-glu-curonic	N-acetil D-glu-cozamină	0	0	corp vitros, cartilaj, lichid sinovial
Condroltin 4-sulfat	5 000—50 000		Acid D-glu-curonic	N-acetil D-ga-lactozamină	0,2—1,0	D-galactoză	cartilaj, oase, artere, cornee, piele
Condroltin 6-sulfat	5 000—50 000		Acid D-glu-curonic	N-acetil D-ga-lactozamină	0,2—2,0	"	cornee, nase, artere, piele
Dermatan sulfat	15 000—40 000		Acid D-glu-curonic sau Acid L-iduronic	"	1,0—2,0	"	piele, sînge, inimă, valve
Heparan sulfat	5 000—12 000		"	N-acetil D-glu-cozamină	0,2—3,0	"	artere, plămîni, suprafața celulelor
Heparină	6 000—25 000		"	"	2,0—3,0	"	ficat, piele, plămîni
Keratan sulfat	4 000—19 000		D-galactoză	"	0,9—1,8	D-galactozamină, D-monoză, L-fucoză, acid sialic	cartilaj, cornee

deosebit este fibronectina, considerată a juca un rol important în procesul de adeziune celulară și avind implicații în transformarea neoplazică a țesuturilor.

Unele glicoproteine servesc transportului unor compuși endo- sau exogeni (ferritina, ceruloplasmina, haptoglobina, factorul intrinsec, proteinele de transport al unor hormoni etc.)

Protejarea suprafețelor intra- și extracelulare împotriva unor factori mecanici sau chimici ca și a unor agresiuni bacteriene sau virale se realizează cu participarea glicoproteinelor.

## VII.10. PROTEOGLICANII

Proteoșlicanii (PG) sînt biomolecule conținînd fragmente heteropolizaharidice neramificate, legate covalent la partea proteică a moleculei. Conținutul glucidic al proteoglicanilor variază între 85—90% din masa moleculei.

Proteoșlicanii se găsesc în substanța fundamentală care umple spațiul dintre celule, în cartilajii, tendoane, piele, lichid sinovial. Interacțiunile între proteoglicani și moleculele de collagen, elastină, fibronectină sînt decise în organizarea matricei extracelulare.

În proteoglicani, polizaharidele sînt constituite din unități dizaharidice repetabile care conțin învariabil o ozamină (glucozamina sau galactozamina); din acest motiv fragmentele glucidice ale proteoglicanilor sînt denumite și glicozaminoglicani (GAG). Cealaltă componentă a unității dizaharidice este reprezentată (cu o excepție) de acidul glucuronic sau epimerul său la C<sub>5</sub> — acidul iduronic. Toate unitățile dizaharidice (cu o excepție) conțin grupări sulfat legate covalent la oxigen sau azot.

Diferențele structurale între glicozaminoglicani sînt determinate de:

- natura monozaharidelor ce constituie unitatea dizaharidică;
- configurația animerică și poziția legăturii glicozidice ce se stabilește în și între unitățile dizaharidice;
- numărul și localizarea grupărilor sulfat.

Se cunosc șapte tipuri de glicozaminoglicani, a căror structură este reprezentată în Tabelul VII.1. De remarcă că glicozaminoglicanii sînt poliani- oni, rezultat al numărului mare de anioni carboxilat și sulfat prezenți în mole- cule, caracteristică structurală esențială care le determină implicarea funcțio- nală. Cu excepția acidului hialuronic, care formează lanțuri heteropolizaharidice solitare, ceilalți glicozaminoglicani se asociază covalent cu proteine, formînd proteoglicani. În majoritatea cazurilor legătura între glicozaminoglicani și proteine este o legătură oxigen-glicozidică stabilită între serină și xiloza apar- ținînd unei unități trizaharidice de legătură (serină-xiloză-galactoză-galac- toză-[Monozaharid I-Monozaharid II]<sub>n</sub> (fig. VII.29). Uneori legătura cu pro- teina se stabilește între N-acetil-galactozamină și serină, treonină sau aspara- gină.



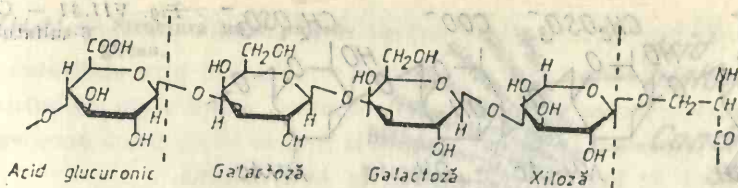


Fig. VII.29 — Legătura dintre glicozaminoglican și proteină.

Caracterul hidrofil puternic și densitatea mare de sarcină negativă, care le permite să lege cationi osmotici activi, fac ca proteoglicanii să lege mari cantități de apă. Acest fapt, ca și rigiditatea lanțurilor polizaharidice, exclude posibilitatea formării unor structuri globulare compacte. Proteoglicanii ocupă ca atare volume disproporționate de mari față de procentul de greutate pe care-l reprezintă din masa proteinelor mediului extracelular. Organizarea aceasta difuză și hidratarea avansată a moleculelor, care formează geluri chiar la concentrații mici, ușurează migrarea moleculelor acvasolubile, în mediul extracelular. Creșterea concentrației de acid hialuronic în timpul morfogenezei și reparării tisulare subliniază importanța acestor atribute.

Acidul hialuronic, singurul GAG nesulfat, este un polimer linear cu masă moleculară foarte mare (de ordinul milioane) constituit din acid glucuronic și N-acetil-glucosamină, legate alternativ prin legături  $\beta$ -(1, 3)-glucuronidice și  $\beta$  (1, 4)-glucosaminidice (fig. VII.30). Este prezent în țesutul conjunctiv, piele, corpul vitros, cartilajii, lichid sinovial. Se pare că, spre deosebire de ceilalți glicozaminoglicani, acidul hialuronic nu este legat de o moleculă proteică. El poate forma însă arhitecturi moleculare „gigant” prin asamblare cu proteoglicani conținând cu precădere condroitin sulfați.

Legăturile glicozidice ale acidului hialuronic pot fi hidrolizate de către hialuronidaza bacteriană, ceea ce duce la alterarea capacității de filtru selectiv al substanței fundamentale și la expunerea țesuturilor la invazia bacteriană.

Condroitin sulfații sînt glicozaminoglicanii majori din proteoglicanii cartilagiilor, arterelor, corneei, constituiți din unități de acid glucuronic și N-acetil-galactozamină legate  $\beta$ -(1, 3)-glucuronidic și  $\beta$ -(1, 4)-galactozaminidic

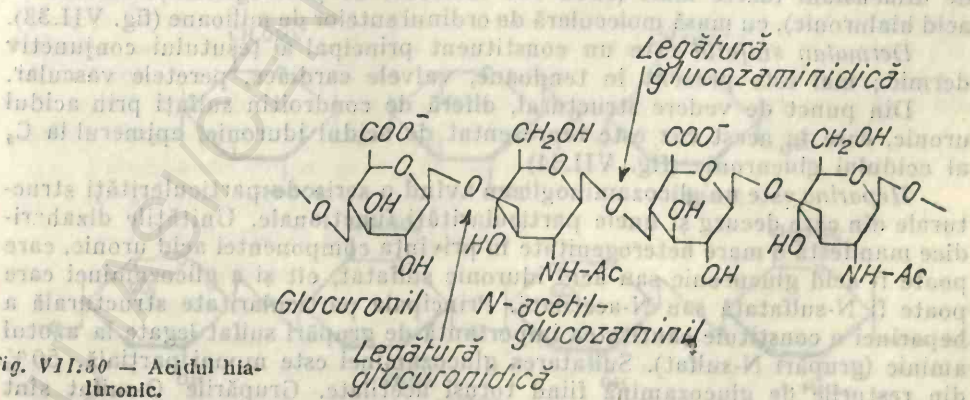


Fig. VII.30 — Acidul hialuronic.

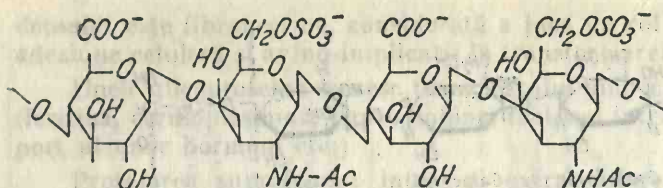
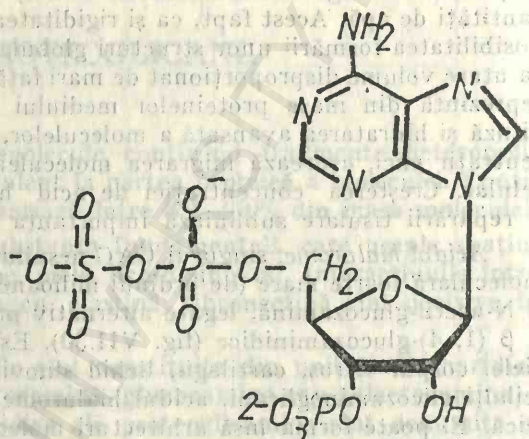


Fig. VII.31 — Condroitin 6-sulfatul.

Glucuronil N-acetil-  
6-sulfat-  
galactozaminil

Fig. VII.32 — 3-fosfo-adenozil-5 fosfo-sulfatul.



(fig. VII.31). Rezidiile de N-acetil-galactozamină sînt sulfatate în pozițiile 4 sau 6 (condroitin-4, respectiv 6-sulfai). Ca donori de grupări sulfat active funcționează 3-fosfo-adenozil-5-fosfosulfatul (fig. VII.32).

Numărul mare de sarcini negative din molecula condroitin sulfatilor îi consacră ca rășini schimbătoare de cationi, cu rol important în reglarea homeostaziei matricei cartilajului și în mineralizarea matricei osoase.

Proteoglicanii conținînd condroitin sulfai se asociază prin intermediul unor proteine de legare cu acidul hialuronic, formînd agregate supramoleculare de dimensiuni foarte mari (circa 100 molecule de proteoglicani/moleculă de acid hialuronic), cu masă moleculară de ordinul sutelor de milioane (fig. VII.33).

*Dermatan sulfatul* este un constituent principal al țesutului conjunctiv dermic; mai este prezent în tendoane, valve cardiace, peretele vascular.

Din punct de vedere structural, diferă de condroitin sulfai prin acidul uronic, care în acest caz este reprezentat de acidul iduronic, epimerul la C<sub>3</sub> al acidului glucuronic (fig. VII.34).

*Heparina* este un glicozaminoglican avînd o serie de particularități structurale din care decurg și unele particularități funcționale. Unitățile dizaharidice manifestă o mare heterogenitate în privința componentei acid uronic, care poate fi acid glucuronic sau acid iduronic sulfat, cît și a glicozaminei care poate fi N-sulfată sau N-acetilată. Principala particularitate structurală a heparinei o constituie cantitatea importantă de grupări sulfat legate la azotul aminic (grupări N-sulfat). Sulfatarea glucozaminei este numai parțială, 50% din resturile de glucozamină fiind totuși acetilate. Grupările O-sulfat sînt



Fig. VII.33 — Structura unui proteoglican.

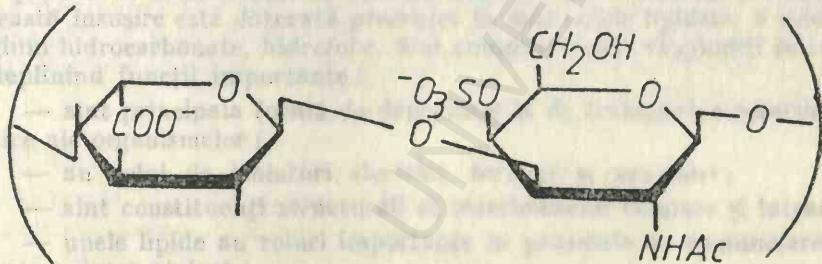
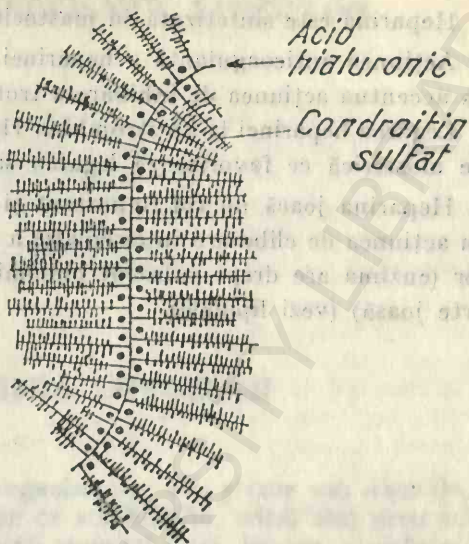
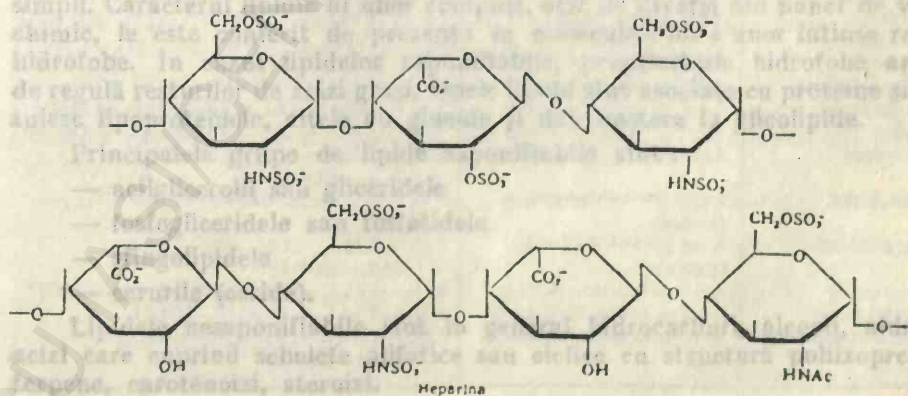


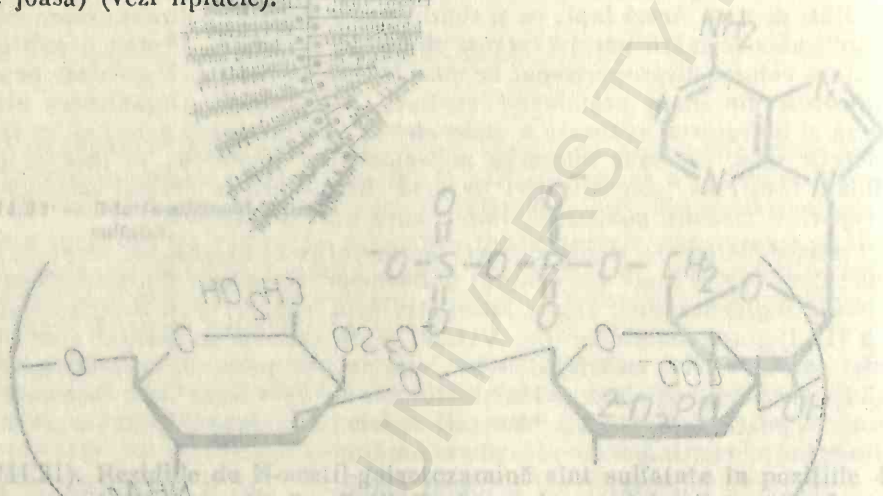
Fig. VII.34 — Dermatan sulfatul.

localizate în general la  $\text{C}_6$  al glucozaminei și  $\text{C}_2$  al acidului iduronic. O structură posibilă a heparinei, cu o distribuție arbitrar aleasă a resturilor sulfat și a tipului de acid uronic, este redată mai jos :



Acțiunea anticoagulantă a heparinei s-ar explica prin abilitatea acesteia accentua acțiunea de inhibare a trombinei, manifestată de antitrombina. Legarea heparinei la antitrombina III induce în molecula acesteia o tran-alosterică ce favorizează legarea sa la trombină.

Heparina joacă un rol important și în procesul de clarifiere a plasmei prin acțiunea de eliberare în circulație a lipoprotein lipazei din pereții capilarelor (enzima are drept substrat chilomicronii și lipoproteinele de densitate foarte joasă) (vezi lipidele).





## Cap. VIII. METABOLISMUL LIPIDELOR

### VIII.1. CHIMIA LIPIDELOR

Lipidele sînt constituenți ai organismelor vii, plante sau animale, care se aseamănă prin caractere comune de solubilitate, adică sînt greu solubile în apă, dar se dizolvă ușor în solvenți nepolari (eter, benzen, cloroform etc.). Această însușire este datorată prezenței în moleculele lipidelor a unor întinse regiuni hidrocarbonate, hidrofobe. Sînt compuși foarte răspîndiți în lumea vie îndeplinind funcții importante :

- sînt principala formă de depozitare și de transport a rezervelor energetice ale organismelor ;
- au rolul de izolatori electrici, termici și mecanici ;
- sînt constituenți structurali ai membranelor celulare și intracelulare ;
- unele lipide au roluri importante în procesele de comunicare și recunoaștere intercelulară ;
- sînt vitamine, hormoni etc.

Natura chimică a lipidelor este foarte variată. Unele cuprind acizi grași, legați esteric sau amidic și care prin hidroliză sînt descompuse în substanțele componente. Acestea sînt *lipidele saponifiabile*. O a doua clasă, *lipidele nesaponifiabile*, reunește diverse categorii de compuși, hidrocarburi superioare, derivați oxigenați ai acestora, care nu sînt scindate hidrolitic în compuși simpli. Caracterul lipidic al unor compuși, atît de diverși din punct de vedere chimic, le este conferit de prezența în moleculele lor a unor întinse regiuni hidrofobe. În cazul lipidelor saponifiabile, proprietățile hidrofobe aparțin de regulă resturilor de acizi grași. Unele lipide sînt asociate cu proteine și alcătuiesc lipoproteinele, altele cu glucide și dau naștere la glicolipide.

Principalele grupe de lipide saponifiabile sînt :

- acilglicerolii sau gliceridele
- fosfogliceridele sau fosfatidele
- sfingolipidele
- cerurile (ceride).

Lipidele nesaponifiabile sînt în general hidrocarburi, alcooli, aldehyde, acizi care cuprind schelete alifactice sau ciclice cu structură poliizoprenică : terpeni, carotenoizi, steroizi.

## VIII.1.1. ACIZII GRAȘI

Acizii grași sînt componenți ai majorității lipidelor saponifiabile. În lipidele izolate de la diverse specii de plante și animale au fost identificați peste 100 acizi diferiți. Totuși, acizii grași tipici cei mai răspîndiți și cei mai abundenți sînt acizii monocarboxilici alifatici cu catenă normală, saturată sau nesaturată, și cuprind un număr pereche de atomi de carbon (de la 4 la 26). Acizii grași ciclici, cu catenă ramificată, cu număr impar de atomi de carbon sau cuprinzînd și alte grupări funcționale sînt întîlniți în natură doar ocazional.

Acizii grași saturați,  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ , cei mai răspîndiți în lipidele izolate din țesuturile mamiferelor sînt acidul palmitic ( $\text{C}_{16}$ ) și acidul stearic ( $\text{C}_{18}$ ). Acidul lignoceric ( $\text{C}_{24}$ ) se află în cantități apreciabile în unele lipide din substanța nervoasă. Acizii inferiori ( $\text{C}_4-\text{C}_{10}$ ) sînt mai abundenți în grăsimile din laptele rumegătoarelor. Grăsimile din laptele uman cuprind doar urme din acești acizi.

Acizii grași nesaturați cuprind una sau mai multe legături duble etilenice. Acești acizi sînt caracterizați prin lungimea catenei hidrocarbonate și prin poziția dublei (sau a dublelor) legături:  $\text{C}_n : \Delta^m$ . Cei mai importanți acizi grași nesaturați sînt acidul palmitoleic ( $\text{C}_{16} : \Delta^9$ ), acidul oleic ( $\text{C}_{18} : \Delta^9$ ), acidul linoleic ( $\text{C}_{18} : \Delta^{9,12}$ ), acidul linolenic ( $\text{C}_{18} : \Delta^{9,12,15}$ ), acidul  $\gamma$ -linolenic ( $\text{C}_{18} : \Delta^{6,9,12}$ ), acidul arahidonic ( $\text{C}_{20} : \Delta^{5,8,11,14}$ ).

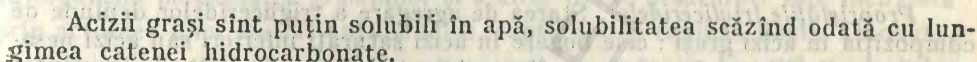
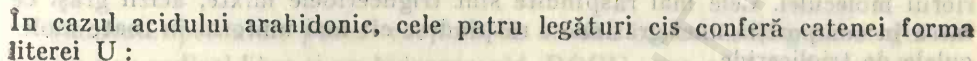
Tabel VIII.7

Acizi grași saturați și nesaturați

Denumire uzuală	Denumire științifică	Formula
Acid butiric	Acid butanoic	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$
Acid caproic	Acid hexanoic	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-\text{COOH}$
Acid caprilic	Acid octanoic	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_6-\text{COOH}$
Acid capric	Acid decanoic	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_8-\text{COOH}$
Acid lauric	Acid dodecanoic	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{COOH}$
Acid miristic	Acid tetradecanoic	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{12}-\text{COOH}$
Acid palmitic	Acid hexadecanoic	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{COOH}$
Acid stearic	Acid octadecanoic	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{16}-\text{COOH}$
Acid arahaic	Acid icosanoic	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{18}-\text{COOH}$
Acid behenic	Acid docosanoic	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{20}-\text{COOH}$
Acid lignoceric	Acid tetracosanoic	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{22}-\text{COOH}$
Acid palmitoleic	Acid $\Delta^9$ -hexadecenoic	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$
Acid oleic	Acid $\Delta^9$ -octadecenoic	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$
Acid linoleic	Acid $\Delta^{9,12}$ -octadecadienoic	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-(\text{CH}=\text{CH}=\text{CH}_2)_2-$ $-(\text{CH}_2)_6-\text{COOH}$
Acid linolenic	Acid $\Delta^{9,12,15}$ -octadeca- trienoic	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_3-(\text{CH}_2)_6-$ $-\text{COOH}$
Acid arahidonic	Acid $\Delta^{5,8,11,14}$ -icosate- traenoic	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_4-$ $-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$
Acid nervonic	Acid $\Delta^{15}$ -tetracosenoic	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_{15}-\text{COOH}$
Acid cerebronic	Acid $\alpha$ -hidroxilignoceric	$\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_{21}-\text{CHOH}-\text{COOH}$
Acid hidroxinevro- nic	Acid $\alpha$ -hidroxitetraose- noic	$\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_{12}-$ $-\text{CHOH}-\text{COOH}$



Acizii grași etilenici prezintă izomerie cis-trans. Formele naturale ale acestor acizi sînt totdeauna izomerii cis. Configurația cis a unei duble legături determină o îndoire cu 30° a catenei hidrocarbonate. Prin această este perturbată așezarea ordonată paralelă a catenelor lungi ale acizilor grași. Nesaturarea acizilor grași este un element de reglare a fluidității lipidelor care îi cuprind și, respectiv, a membranelor biologice. Acidul oleic cu o legătură dublă are configurația :



— formează săruri, săpunuri, cu proprietăți tensioactive;

- formează amide (sfingolipide).

— adăunează hidrogen, halogeni ;

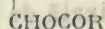
- suferă procesul de peroxidare.

Sint lipidele cele mai abundente din natură. Sint componentele principale ale grăsimilor de rezervă din țesuturi și ale grăsimilor din lapte. În proporții variabile se găsesc și în lipoproteinele plasmatice.

 $\text{CH}_2\text{OCOR}$  $\alpha$ -sau

1-acilglicerol

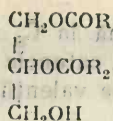
(monoglycerid)



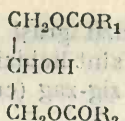
C-sau

2-acilglicerol

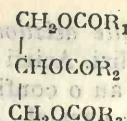
(monoglycerid)



$\alpha$ ,  $\beta$ -sau  
1,2-diacylglicerol  
(diglicerid)



$\alpha$ ,  $\alpha'$ -sau  
1,3-diacylglicerol  
(diglicerid)



triacylglicerol  
(triglicerid)

Grăsimile de rezervă sînt alcătuite aproape exclusiv din trigliceride. Mono- și digliceridele sînt intermediari în cursul sintezei și degradării trigliceridelor și se găsesc în țesuturi în cantități mici.

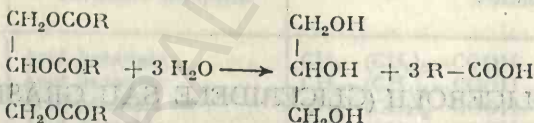
Trigliceridele naturale există într-o varietate foarte mare diferențiindu-se atît prin natura acizilor grași constituenți, cît și prin aranjarea lor în interiorul moleculei. Cele mai răspîndite sînt trigliceridele mixte, acizii grași ce intră în compoziția unei grăsimi se răspîndesc cît mai uniform în toate moleculele de trigliceride.

Trigliceridele din țesutul adipos uman cuprind următorii acizi grași (în procente din greutate): acid oleic (45%), acid palmitic (25%), acid linoleic (8%), acid palmitoleic (7%), acid stearic (7%), alți acizi (8%).

*Proprietățile trigliceridelor.* Starea de agregare a trigliceridelor depinde de compoziția în acizi grași: cele bogate în acizi saturați inferiori sau acizi nesaturați sînt lichide; cele cu un conținut ridicat în acizi saturați superiori sînt solide. Tributirina și trioleina sînt lichide, tristearina este solidă. Grăsimile naturale sînt amestecuri de diverse trigliceride, ele nu au un punct de fierbere sau de topire net. Cele solide prin încălzire se înmoaie treptat.

Trigliceridele au densități mai mici decît apă (0,96 g/cm<sup>3</sup>). Avînd caracter hidrofob foarte pronunțat nu se dizolvă în apă. Monogliceridele și digliceridele au un slab caracter amfipatic.

Trigliceridele sînt hidrolizate în glicerol și acizi grași:



În laborator această reacție necesită condiții energice, temperaturi ridicate și/sau catalizatori. În organism hidroliza trigliceridelor este catalizată de enzime denumite triglicerid-lipaze.

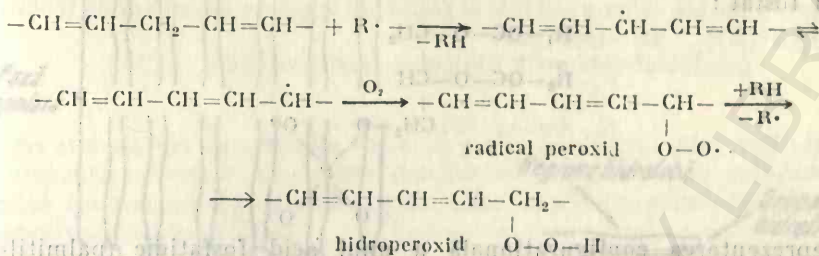
Catenele hidrocarbonate nesaturate ale resturilor acil prezintă proprietățile specifice nesaturării. Grăsimile nesaturate adăugază hidrogen. De exemplu, trioleina prin hidrogenare totală se transformă în tristearină. Hidrogenarea este asociată cu creșterea punctului de topire al grăsimii. Uleiurile vegetale solidificate prin hidrogenare sînt utilizate la prepararea margarinei.

Grăsimile nesaturate adăugază halogeni, brom sau iod. Cantitatea de halogen fixată de o grăsimă (g iod/100 g grăsimă) este o măsură a gradului de nesaturare a grăsimii (indice sau cifră de iod).

Grăsimile nesaturate, îndeosebi acelea care cuprind acizi polietilenici, prin expunere la lumină, la aer și în prezența unor factori care generează radicali liberi, suferă un proces de peroxidare (autooxidare) care le alterează



gustul și mirosul (rîncezire). Acest proces este inițiat de un radical liber ce se formează în sistem și se propagă în lanț. Poziția cea mai vulnerabilă la un atac radicalic este poziția învecinată unei duble legături, poziția alilică :

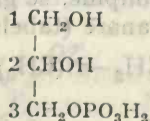


Radicalul peroxidic poate reacționa cu o nouă moleculă de grăsime generînd un nou radical liber și un hidroperoxid, ROOH, procesul desfășurîndu-se în lanț. Hidroperoxidul la rîndul lui generează alți radicali liberi și diverși produși de oxidare, de polimerizare, de sciziune a lanțurilor hidrocarbonate. În organism peroxidarea grăsimilor și a altor lipide nesaturate este întîrziată prin acțiunea unor factori antioxidanți, captatori de radicali liberi. Totodată, organismul dispune de multiple mecanisme de apărare împotriva efectelor nocive ale peroxizilor.

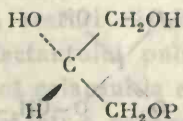
### VIII.1.3. FOSFOGLICERIDELE (GLICEROFOSFOLIPIDELE, FOSFATIDELE)

Această categorie de lipide cuprinde cele mai importante lipide structurale. În asociere cu proteine și alte lipide alcătuiesc membranele tuturor celulelor animale și vegetale.

Substanța de bază a acestor lipide este glicerol-fosfatul (sn-3-glicerol fosfat, sn de la stereochemical numbering) :

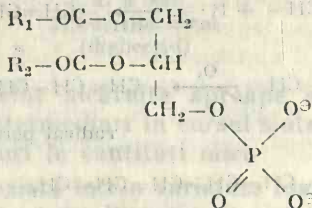


Configurația acestui compus este :

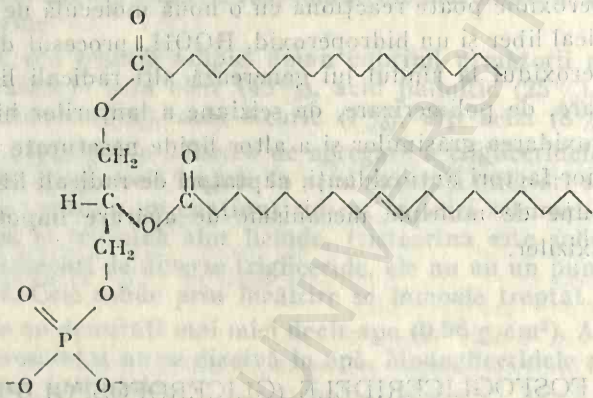


### VIII.1.3.1. Acizii fosfatidici

Acizii fosfatidici cuprind două resturi acil (de regulă diferiți) legate la glicerol fosfat :



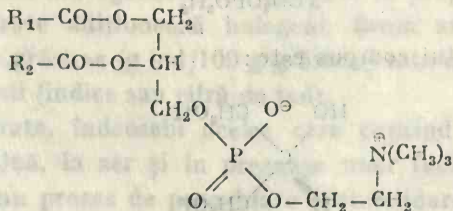
Reprezentarea configurațională a unui acid fosfatidic (palmitil-oleil-glicerol fosfat) este :



Acizii fosfatidici se găsesc în organismele vii în cantități mici și sînt intermediari în metabolismul fosfatidelor. De la acizii fosfatidici prin legarea grupei fosforil la diverși alcooli rezultă fosfatidele: fosfatidil-coline, fosfatidil-etanolamine, fosfatidil-serine, fosfatidil-inozitoli, fosfatidil-gliceroli.

### VIII.1.3.2. Fosfatidil-colinele (lecitine)

Sint cele mai abundente fosfolipide, se găsesc în proporția cea mai mare în structurile lipoproteice membranare (tabelul VIII.2). Cuprind restul fosfatidil legat de colină :  $\text{HOCH}_2\text{—CH}_2\text{—N}(\text{CH}_3)_3$ . Formula generală a unei lecitine este :





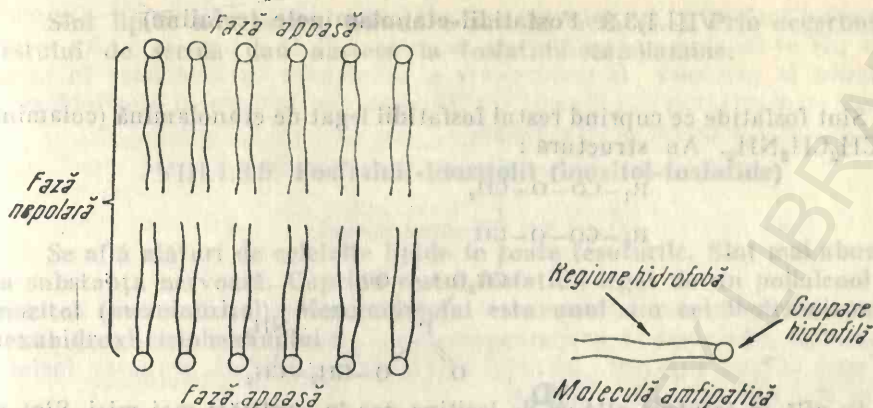


Fig. VIII.1 — Strat dublu lipidic.

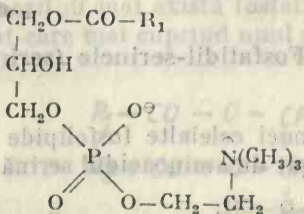
Restul acil din poziția 1 este de regulă saturat iar  $R_2$  nesaturat, adesea provine din acid linoleic, acid arahidonic. Prezența acestor resturi nesaturate face ca lecitinele să fie foarte sensibile la procesul de peroxidare.

Lecitinele au structură de amfioni (bipolară) prin sarcina negativă a restului fosforil și sarcina pozitivă a grupării cuaternare de amoniu.

Prezența resturilor acil-hidrofobe și a sarcinilor electrice pozitivă și negativă conferă lecitinelor caracter amfipatic și proprietăți tensioactive puternice. În apă fosfatidil-colinele se dizolvă formînd agregate, miceli, alcătuite din două straturi lipidice (fig. VIII.1).

Acest strat dublu lipidic este stabilizat prin forțele van der Waals dintre catenele hidrocarbonate ale resturilor acil aranjate paralel și, pe de altă parte, prin interacțiunile electrostatice dintre grupările polare. Totodată, eliberarea apei sechestrare între resturile acil hidrofobe mărește stabilitatea bistratului lipidic. Asocierea spontană a lipidelor amfipatice sub formă de bistraturi stă la baza formării membranelor biologice cu o structură dublu lipidică.

Derivații lecitinelor (și a altor fosfatide) care cuprind un rest acil mai puțin se numesc lizolecitine (lizofosfatide) :

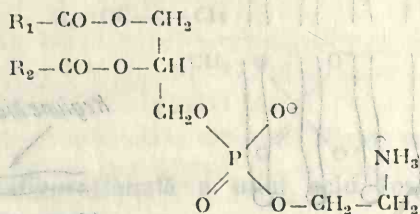


și au proprietăți tensioactive mai puternice decît ale lecitinelor.

Fosfatidil-colina cu două resturi dipalmitil este componentul lipidic principal (80—90%) al „surfactantului pulmonar“, material care acoperă alveolele pulmonare și împiedică colapsul la expirare. Alături de această lecitină surfactantul mai cuprinde într-o proporție mare fosfatidil-glicerol.

### VIII.1.3.3. Fosfatidil-etanolaminele (cefaline)

Sint fosfatide ce cuprind restul fosfatidil legat de etanolamină (colamină) :  $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ . Au structura :



Se află în țesături alături de lecitine dar în cantități mai mici. Sînt mai abundente în lipidele din țesutul nervos (tabel VIII.2). Fosfatidil-etanolaminele au structură amfionică, au caracter amfipatic, sînt sensibile la peroxidaze. Prin metilarea grupării aminice se transformă în lecitine.

*Tabel VIII.2*

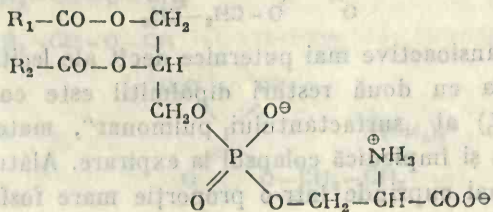
### Compoziția lipidică a unor membrane

(după „Molecular Biology of the Cell“ Bruce Alberts, Garland Publishing, Inc. New York, 1983)

<i>Lipide</i>	<i>Mem- brană plasmatică hepatocit</i>	<i>Mem- brană eritrocit</i>	<i>Mielină</i>	<i>Mem- brană mitocon- drială</i>	<i>Relicul endo- plasmatic</i>	<i>Mem- brană E. cōlt</i>
Colesterol	17	23	22	3	6	0
Fosfatidilcoline	24	17	10	39	40	0
Fosfatidiletanolamine	7	18	15	35	17	70
Fosfatidilserine	4	7	9	2	5	urme
Sfingomieline	19	18	8	0	5	0
Glicolipide	7	3	28	urme	urine	0
Altele	22	13	8	21	27	30

#### VIII.1.3.4. Fosfatidil-serinele (serin-cefaline)

Însoțesc în cantități mici celelalte fosfolipide în membranele biologice. Cuprind restul fosfatidil legat de aminoacidul serină :

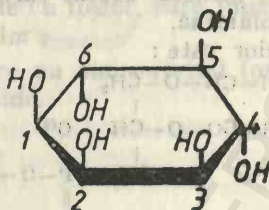




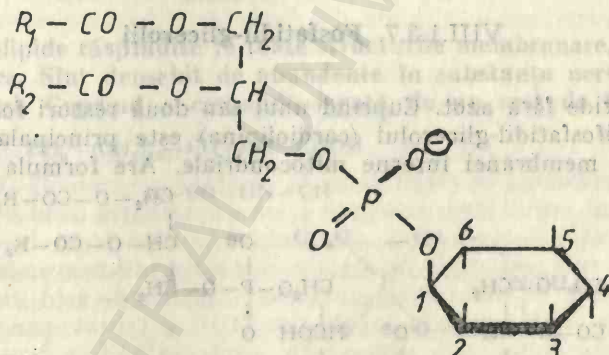
Sînt lipide amfipatice, posedă o sarcină netă (—). Prin decarboxilarea restului de serină dau naștere la fosfatidil-etanolamine.

### VIII.1.3.5. Fosfatidil-inozitolii (inozitol-fosfatide)

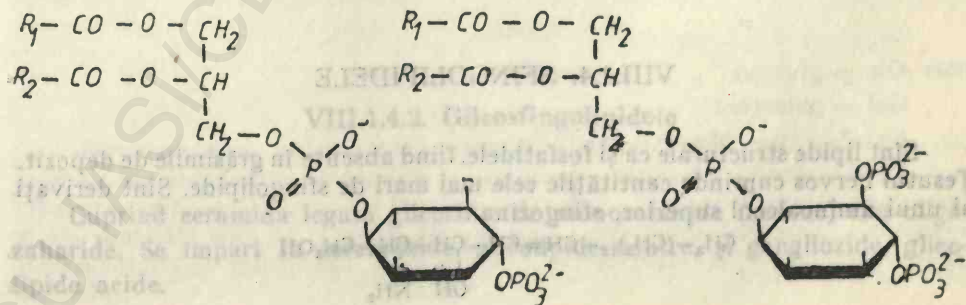
Se află alături de celelalte lipide în toate țesuturile. Sînt mai abundente în substanța nervoasă. Cuprind restul fosfatidil legat de un polialcool ciclic, inozitol (mezoinozitol). Mezoinozitolul este unul din cei 9-stereoizomeri ai hexahidroxi-ciclohexanului:



Fosfatidil-inozitolii au structura :



Pe lângă fosfatidil-inozitoli mai există fosfatidil-inozitoli-4-fosfat și fosfatidil-inozitoli-4,5-bisfosfat care mai cuprind unul sau două resturi fosfat legate la inozitol:

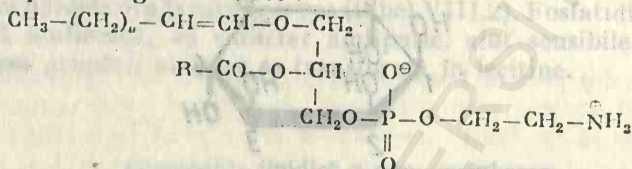


Inozitol-fosfatidele au caracter amfipatic, sint lipide cu caracter puternic acid, la pH-ul fiziologic poartă sarcini negative, de la 1 pînă la 5. Au roluri importante în procesele de transmitere a semnalelor extracelulare în toate țesuturile; sub acțiunea fosfolipazei C eliberează diacilglicerol și inozitol fosfați efectori ai unor mesageri extracelulari.

### VIII.1.3.6. Plasmalogenele

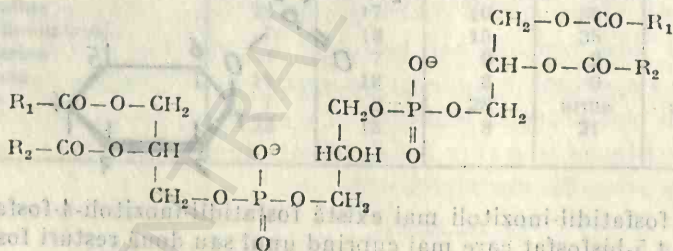
Sint fosfolipide mai abundente în mușchi și nervi. Se deosebesc de celelalte fosfatide prin aceea că gruparea alcoolică C<sub>1</sub> din glicerol este legată eteric de un enol alifatic superior; alcoolul azotat care esterifică gruparea fosforil este, cel mai frecvent, etanolamina.

Structura plasmalogenelor este:



### VIII.1.3.7. Fosfatidil-glicerolii

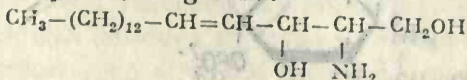
Sint fosfatide fără azot. Cuprind unul sau două resturi fosfatidil legate de glicerol. Difosfatidil-glicerolul (cardiolipina) este principala componentă fosfolipidică a membranei interne mitocondriale. Are formula:



Fosfatidil-glicerolul este component al surfactantului pulmonar.

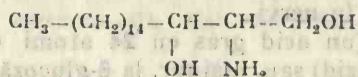
### VIII.1.4. SFINGOLIPIDELE

Sint lipide structurale ca și fosfatidele, fiind absente în grăsimile de depozit. Țesutul nervos cuprinde cantitățile cele mai mari de sfingolipide. Sint derivați ai unui aminoalcool superior, sfingozina:

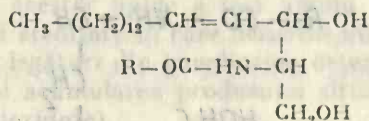




sau, mai rar, a derivatului hidrogenat, dihidrosfingozină :



În sfingolipide acidul gras este legat amidic la gruparea  $-\text{NH}_2$  din sfingozină. Toate sfingolipidele cuprind această amidă, ceramidă :

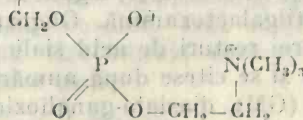
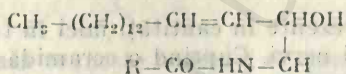


Există două categorii de sfingolipide :

- sfingomielinele, lipide cu fosfor, care împreună cu glicerofosfolipidele, alcătuiesc grupa fosfolipidelor;
- glicosfingolipide, care nu mai cuprind fosfor, ci unul sau mai multe resturi glicozil, sint glicolipide.

#### VIII.1.4.1. Sfingomielinele

Sint fosfolipide răspândite în toate structurile membranare, în lipoproteinele plasmatice. Sint deosebit de abundente în substanța nervoasă albă, în nervii periferici. Cuprind o ceramidă legată de un rest de fosforil-colină :



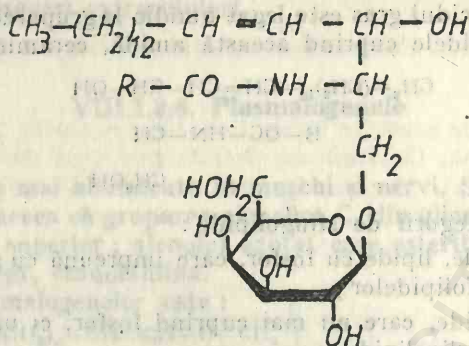
Proprietățile sfingomielinelor sint asemănătoare cu ale fosfatidelor, sint amfioni, au caracter amfipatic. Restul acil și catena hidrocarbonată a sfingozinei însumează un număr de atomi de carbon aproximativ egal cu acela al resturilor acil din lecitine.

#### VIII.1.4.2. Glicosfingolipidele

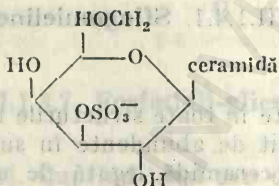
Cuprind ceramida legată glicozidic de monozaharide (hexoze) sau oligozaharide. Se împart în cerebrozide, glicolipide neutre, și ganglioze, glicolipide acide.

Cerebrozidele se găsesc în majoritatea ţesuturilor dar sînt mai abundente în creier (substanţa albă), în nervi.

Cuprind o ceramidă (un acid gras cu 24 atomi de carbon) legată la  $\beta$ -galactoză (galactocerebrozid) sau, mai rar, la  $\beta$ -glucoză (glucocerebrozid) :

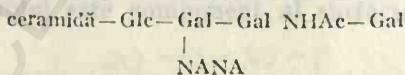


Cerebrozidele nu au sarcini electrice ; au caracter amfipatic. În creier, galactocerebrozidele mai cuprind şi resturi sulfat legate esteric de galactoză, lipide polare denumite sulfatide :



Gangliozele sînt glicolipide prezente în cantităţi mici în toate ţesuturile, dar sînt mai abundente în creier şi nervi. Cuprind o ceramidă (în care acidul gras este frecvent acidul stearic) legată la un oligozaharid alcătuit din glucoză, galactoză, N-acetilgalactozamină. Oligozaharidul este legat la rîndul lui de unul, două sau trei resturi de acid sialic (acidul acetyl-neuraminic). Gangliozele se clasifică şi se citeşte după numărul resturilor de acid sialic, în mono-sialo-ganglioze (GM), di-sialo-ganglioze (GD) şi tri-sialo-ganglioze (GT). Natura oligozaharidului este desemnată printr-un indice numeric, 5-n, în care n arată numărul de unităţi hexozil.

De exemplu, gangliozul GM<sub>1</sub> are structura (simplificată) :



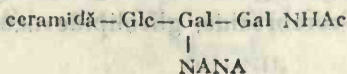
unde Glc = glucoză

Gal = galactoză

Gal NHAc = N-acetil-galactozamină

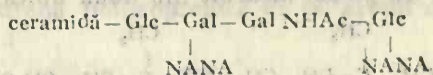
NANA = acid N-acetyl-neuraminic

GM<sub>2</sub> :





GD<sub>1</sub>: ceramidă — Glc — Gal — Gal NHAc — Glc



Componenta glucidică a gangliozidelor se găsește totdeauna pe fața externă a membranelor, aceste lipide sînt implicate în procesele de pe suprafața membranelor. Studiul acestor lipide a fost amplu dezvoltat prin descrierea unui număr de maladii ereditare în care deficitul unor enzime hidrolitice specifice pentru diversele legături din gangliozide determină întreruperea șirului de reacții catabolice și acumularea produsului situat în amonte față de enzima deficitară (gangliozidoze).

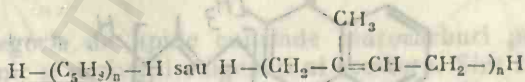
### VIII.1.5. CERURILE

Sînt esterii ai acizilor grași cu alcooli alifatici sau ciclici (steroli). De exemplu, ceara de albine cuprinde în majoritate esterul acidului palmitic cu un alcool cu 32 atomi de carbon. Lanolina, grăsimea de pe lina de oaie, este alcătuită în principal din esterii ai lanosterolului, ai colesterolului.

Cerurile sînt lipide saturate, cu un caracter foarte pronunțat hidrofob. Ele sînt secretate de epiderma plantelor și animalelor și formează un strat protector, împiedicînd pierderile de apă. Cerurile naturale sînt amestecuri complexe de diverși esterii, acizi și alcooli liberi, hidrocarburi superioare.

### VIII.1.6. LIPIDE NESAPONIFIABILE

Această clasă reunește compuși cu proprietăți de solubilitate proprii lipidelor și care nu sînt scindate prin hidroliză. Principalele grupe de lipide nesaponifiabile sînt terpenele, carotenoizii, steroizii. Toți acești compuși au o structură poliizoprenică (poliprenică), sînt formal derivați ai izoprenului. Unii dintre ei au formule poliizoprenice tipice :

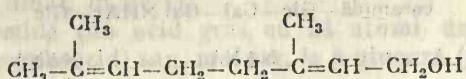


alții prezintă un grad mai mic sau mai mare de nesaturare, cuprind funcții oxigenate.

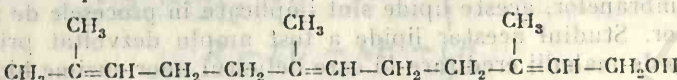
#### VIII.1.6.1. Terpenele

Terpenele sînt hidrocarburi, alcooli, aldehide, acizi cu structură poliizoprenică. Sînt foarte răspîndite în regnul vegetal, intră în compoziția uleiurilor eterice care dau mirosul florilor, al fructelor. Tesuturile animale cuprind și ele cantități mici de terpene. De exemplu, geraniolul, farnesolul, scualenul, intermediari în biosinteza colesterolului, vitaminele K și E, ubiquinona, dolicolul.

Geraniolul este un alcool alcătuit din două unități izoprenice :

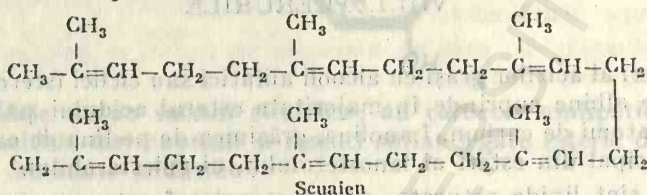


Farnesolul cuprinde trei unități izoprenice :



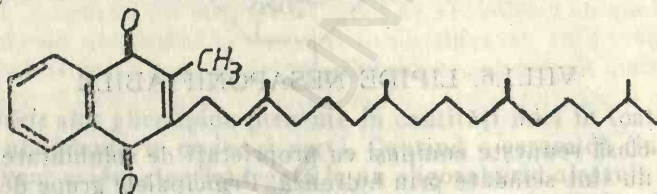
Geraniolul și farnesolul, ca esteri pirofosforici, sînt intermediari în biosinteza colesterolului.

Scualenul este o hidrocarbură  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}$ , alcătuită din 6 unități izoprenice, de fapt din două unități farnesil condensate cap-cap. Scualenul prin ciclizare dă naștere la un compus steroidic.

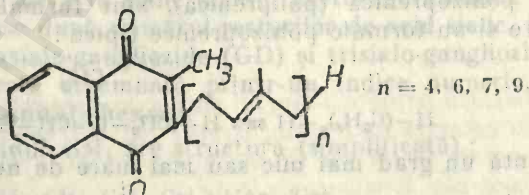


Vitaminele K și E cuprind catene hidrocarbonate poliprenice, care le conferă liposolubilitatea.

Vitaminele K naturale ( $\text{K}_1$  și  $\text{K}_2$ ) au formulele :

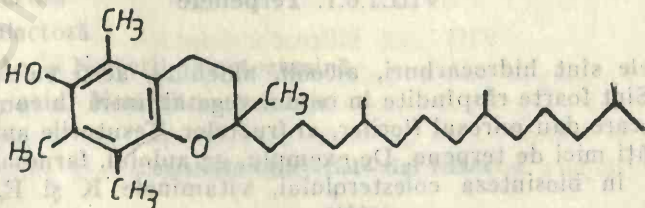


Vitamină  $\text{K}_1$



Vitamină  $\text{K}_2$

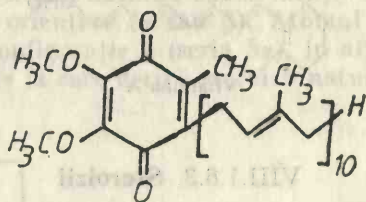
Vitamină E ( $\alpha$ -tocoferolul) are formula :



Vitamină E

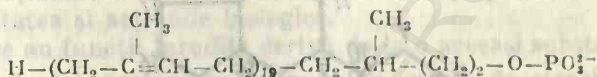


Ubichinona (coenzima Q), component redox al lanțului respirator mitocondrial, cuprinde o catenă poliizoprenică cu 50 atomi de carbon grefată pe nucleul benzochinonei :



Ubichinona

Dolicolii sînt alcooli superiori răspîndiți la plante și animale, conțin între 16 și 20 unități izoprenice ; mamiferele cuprind un compus cu 100 atomi de carbon. Sub formă de ester fosforic, dolicol-fosfat, participă la sinteza glicoproteinelor în reticulul endoplasmatic și în aparatul Golgi avînd formula de mai jos :



Unitatea oligozaharidică a unei glicoproteine se constituie sub formă de glicozil-fosforil-dolicol, după care are loc transferul în bloc al oligozaharidului pe proteina membranară acceptoare. Catena lungă hidrofobă a dolicolului rămîne înglobată în membrana lipidică iar lanțul oligozaharidic protuberează pe fața externă de unde este transferat. În acest fel glicoproteinele cuprind totdeauna componenta glucidică pe suprafața externă a membranei.

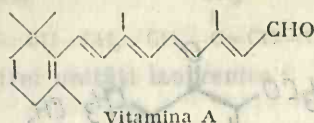
### VIII.1.6.2. Carotenoizii

Această categorie de lipide cuprinde hidrocarburi puternic nesaturate cu schelet izoprenic și derivații oxigenați ai acestora. Sînt răspîndiți în regnul vegetal unde joacă roluri importante în reacțiile fotochimice. Cuprind sisteme întinse cu legături duble conjugate și sînt colorate în roșu-portocaliu. Carotenii  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, sînt hidrocarburi  $\text{C}_{40}\text{H}_{56}$ , răspîndiți în morcovi, tomate și alte plante. Formula  $\beta$ -carotenului este următoarea :



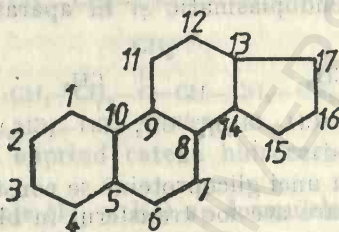
Cuprinde un sistem de 11 legături duble conjugate ; în catena lineară legăturile duble au configurația trans. Carotenii sînt provitamine A. În ficat și în peretele

intestinal din  $\beta$ -caroten prin scindare oxidativă (sub acțiunea unei dioxigenaze) se formează două molecule de vitamină A (retinal) :



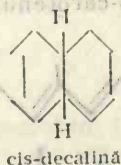
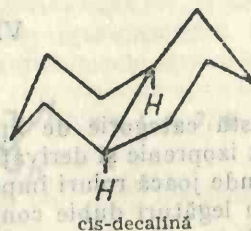
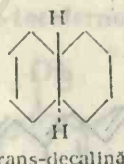
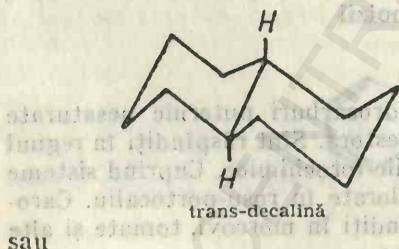
### VIII.1.6.3. Steroizii

În această clasă intră un număr mare de compuși lipidici răspândiți la plante, animale, microorganisme. Sint derivați ai unei hidrocarburi ipotetice denumită stéran (ciclopentanoperhidrofenantren) care cuprinde trei nuclee ciclohexanice și unul ciclopentanic condensate :



Diversii steroizi diferă între ei prin grupări funcționale și catene laterale grefate pe nucleul steranic, prin prezența unor legături duble și prin existența unui număr foarte mare de stereozomeri.

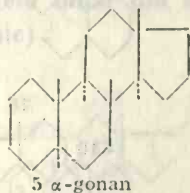
Ciclohexanul prezintă conformația denumită „scaun” și condensarea a două nuclee ciclohexanice conduce la doi stereozomeri, cum este cazul deca- linei (decahidronaftalină) :



Steranul poate exista sub forma a 64 stereozomeri după orientarea rela- tivă a atomilor de hidrogen legați de atomii de carbon de la joncțiunea ciclu- rilor ( $C_5$ ,  $C_{10}$ ,  $C_8$ ,  $C_9$ ,  $C_{13}$  și  $C_{14}$ ). Seriarea formulelor acestor stereozomeri se



face potrivit următoarelor convenții : legăturile dirijate spre partea anterioară a ciclului sînt redată prin linii pline și sînt denumite legături  $\beta$ . Substituenții care se află pe partea opusă (posterioară) sînt legați prin legături  $\alpha$ , redată prin linii întrerupte. În steroizii naturali substituenții de la  $C_{10}$ ,  $C_8$ ,  $C_9$ ,  $C_{13}$  și  $C_{14}$  au totdeauna aceeași orientare ( $\alpha$  sau  $\beta$ ). Atomul de hidrogen de la  $C_5$  are însă în unii steroizi configurație  $\alpha$  (seria 5 $\alpha$ ), în alții  $\beta$  (seria 5 $\beta$ ). Acești doi izomeri ai steranului de la care derivă steroizii naturali au primit denumirea de 5 $\alpha$ - și 5 $\beta$ -gonan :

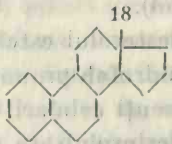
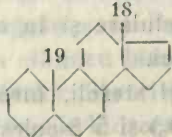
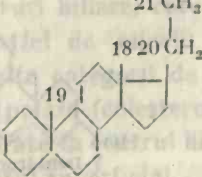


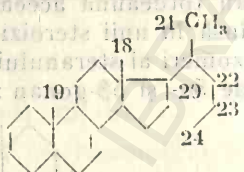
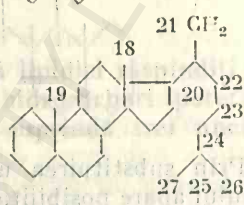
Prin substituirea unui atom de hidrogen dintr-o grupare  $-\text{CH}_2-$  a sternului apare posibilitatea existenței a doi izomeri,  $\alpha$ - și respectiv,  $\beta$ . Legarea unei grupări funcționale  $\alpha$  sau  $\beta$  antrenează diferențe pronunțate în ceea ce privește reactivitatea și acțiunile biologice.

Steroizii care au funcții înrudite derivă de la o aceeași substanță de bază. În tabelul VIII.3 sînt prezentate principalele grupe de steroizi : hormonii estrogeni, androgeni, gestageni, corticosuprarenalieni, acizii biliari și steroli. Substanțele active, cardiotonice din digitală (digitoxigenina, strofantidina, ouabagenina) au de asemenea structură steroidică.

Tabel VIII.3

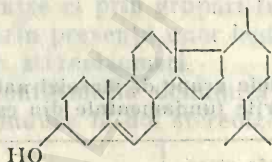
Principalele grupe de steroizi naturali  
și hidrocarburile fundamentale din care derivă

Steroizi naturali	Număr atomi de carbon	Hidrocarbura fundamentală
Hormoni estrogeni	$C_{18}$	Estran 
Hormoni androgeni	$C_{19}$	Androstan 
Hormoni gestageni și corticosteroizi	$C_{21}$	Pregnan 

Sterozii naturali	Număr atomi de carbon	Hidrocarbura fundamentală
Acizi biliari	C <sub>24</sub>	Colan 
Steroli	C <sub>27</sub>	Colestan 

În acest capitol sînt descriși mai departe grupa steroizilor și a acizilor biliari.

Steroli sînt alcooli steroidici prezenți la toate organismele vii. Colesterolul este cel mai important sterol din regnul animal. El lipsește la plante, microorganisme, nevertebrate. Este un component esențial al tuturor structurilor membranare lipoproteice. Este un steroid C<sub>27</sub>, cu formula :

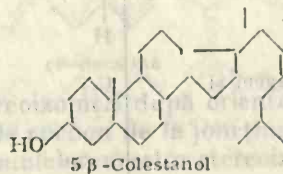
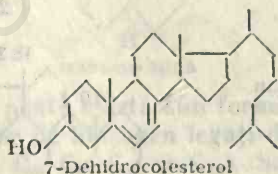


În organism se găsește fie ca alcool liber, fie esterificat cu acizi grași (acil-colesterol).

Colesterolul este o substanță solidă, albă, insolubilă în apă. Are un caracter hidrofob pronunțat. Esterii colesterolului sînt printre cei mai hidrofobi constituenți celulari.

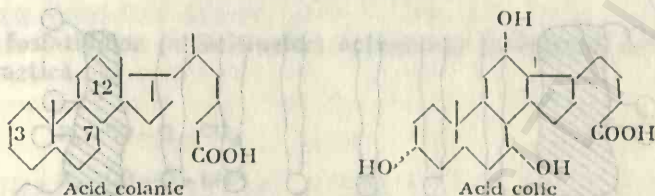
Colesterolul are un rol structural, este prezent în majoritatea membranelor celulare și în același timp este precursorul tuturor celorlalți compuși steroidici.

Alți steroli, înrudiți cu colesterolul sînt 7-dehidrocolesterolul (provitamina D<sub>3</sub>) și 5 β-colestanolul :





Acizii biliari sînt componenți ai bilei. La pH-ul alcalin al bilei se găsesc sub formă de săruri biliare. Joacă roluri importante la solubilizarea și absorbția intestinală a lipidelor. Se formează din colesterol, sinteza și eliminarea acizilor biliari prin fecale reprezintă o cale de excreție a colesterolului. Sînt steroizi  $C_{24}$ . Ei derivă de la un acid ipotetic, acidul colanic. Acizii biliari sînt derivați hidroxiilați ai acidului colanic, în una sau mai multe din pozițiile 3, 7 și 12. Cel mai important acid biliar din bila omului este acidul colic (acid  $3\alpha$ ,  $7\alpha$ ,  $12\alpha$ -trihidroxicolanic):



Alți acizi biliari sînt: acidul chenodezoxilcolic (acid  $3\alpha$ ,  $7\alpha$ -dihidroxicolanic), acidul dezoxicolic (acid  $3\alpha$ ,  $12\alpha$ -dihidroxicolanic), acidul litocolic (acid  $3\alpha$ -hidroxicolanic).

Acizii biliari se află în bilă, sub formă de amide cu glicocolul ( $H_2N-CH_2-COOH$ ) sau cu taurina ( $H_2N-CH_2-CH_2-SO_3H$ ), forme care sînt denumite acizi biliari conjugați. De exemplu acidul glicocolic (colil-NH- $CH_2-COOH$ ) și acidul taurocolic (colil-NH- $CH_2-CH_2-SO_3H$ ). Și aceștia se află în bilă ca săruri.

Acizii biliari liberi sau conjugați au proprietăți unice de solubilitate. Cuprind grupări hidrofilice polare și grupări cu sarcină negativă ( $-COO^-$  sau  $-SO_3^-$ ) care conferă moleculelor caracter hidrofil, iar nucleul hidrocarbonat steric este hidrofob. Regiunile hidrofilă și hidrofobă ale moleculei au o dispoziție diferită de cea a altor lipide amfipatice, la acizii biliari ele reprezintă cele două fețe ale nucleului plat al steranului. Sărurile biliare interacționează cu apa și cu alte lipide într-un mod particular. Singuri se dizolvă în apă formînd soluții micelare prin agregarea unui număr relativ mic de molecule. În prezența altor lipide formează cu mare ușurință agregate micelare mixte. De exemplu, cu fosfatidil-colina (lecitine) formează agregate care iau forma unor mici bastonașe. Moleculele de lecitină formează un cilindru bimolecular, grupările polare fiind dispuse la capete și expuse spre exterior. Sărurile biliare, prin fața hidrofobă a moleculelor, interacționează cu catenele hidrocarbonate ale resturilor acil, învelesc cilindrul cu un strat de săruri biliare, care expun spre exterior grupările lor hidrofile (fig. VIII.2). Astfel de miceli mixte săruri biliare-lecitine au capacitatea de a solubiliza alte categorii de lipide, mai polare (acizi grași, monogliceride) sau mai puțin polare (colesterol, acil-colesterol, trigliceride). Moleculele nepolare sînt incorporate în centrul hidrofob al miceliei iar lipidele amfipatice se intercalează în stratul superficial.

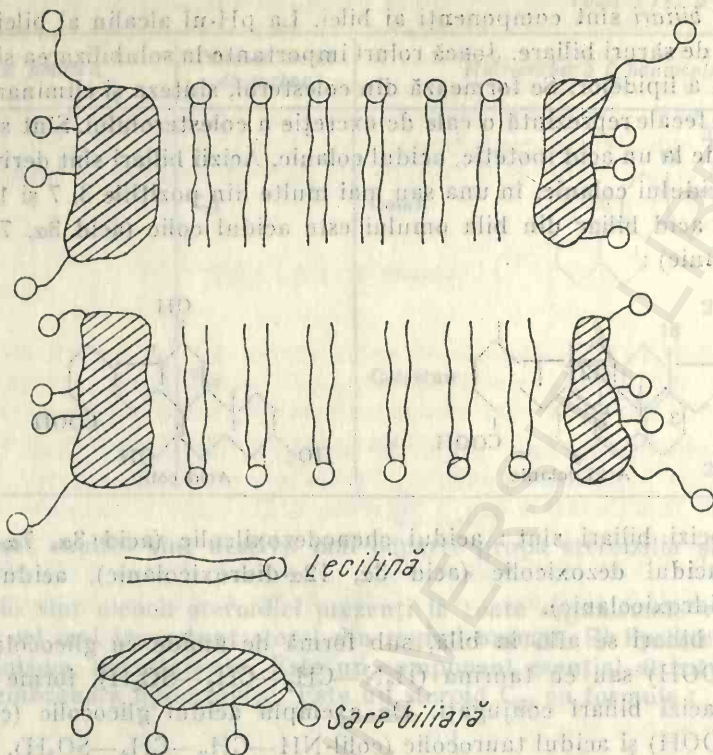


Fig. VIII.2 — Micelie mixtă : lecitine-săruri biliare.

## VIII.2. DIGESTIA ȘI ABSORBȚIA LIPIDELOR

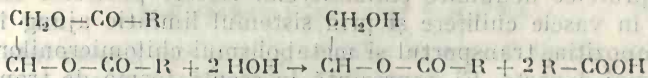
Principalele componente lipidice ale rației alimentare sînt trigliceridele (grăsimile propriu-zise), după care urmează fosfolipidele (lecitine, cefaline, sfingomieline), colesterolul liber și acil-colesterolii. Carotenul și vitaminele liposolubile (A, D, E și K) sînt dizolvate în grăsimi deci un conținut minimal de grăsimi în rație este obligatoriu pentru absorbția acestor compuși. Digestia și absorbția lipidelor este un proces complex, pe lîngă necesitatea degradării lor hidrolitice se mai adaugă problema solubilizării și menținerii într-un mediu apos a unor substanțe hidrofobe. Sărurile biliare deversate cu bila în duoden, împreună cu unele lipide polare, au un rol esențial în solubilizarea și incorporarea lipidelor într-o formă ușor absorbabilă prin peretele intestinal.

Lipidele alimentare cînd vin în contact cu bila, care cuprinde cantități importante de săruri biliare și de lecitine, sînt dispersate sub forma unei soluții coloidale (emulsie) cu un grad de dispersie mijlociu (diametrul particulelor este cuprins între 500 și 1 000 nm). Asupra grăsimilor emulsionate acțio-



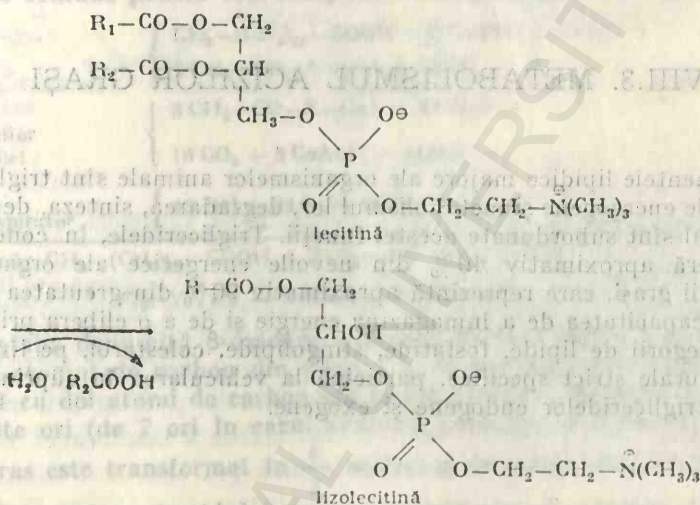
nează hidrolaze pancreatice specifice : lipazele asupra trigliceridelor, fosfolipaze asupra fosfatidelor, colesterolesteraza asupra esterilor colesterolului.

Lipaza (triglicerid-lipaza) pancreatică are specificitate pentru legăturile esterice din pozițiile  $\alpha$  și  $\alpha'$  (1 și 3) ale trigliceridelor :



2-( $\beta$ )-monoglicerid

Asupra fosfatidelor (a lecitinelor) acționează fosfolipaze cu specificitate carboxiesterazică :



Lizolecitinele au proprietăți detergente foarte puternice și contribuie mai departe la solubilizarea lipidelor în intestin.

Colesterolul liber și esterificat prezent în lumenul intestinal provine din trei surse : din alimente, din bilă și din descuamațiile mucoasei intestinale. Esterii colesterolului sînt hidrolizați sub acțiunea colesterolesterazei pancreatice.

Lipidele alimentare nehidrolizate și produșii de hidroliză, insolubili sau parțial solubili în apă, împreună cu sărurile biliare formează o soluție micelară cu un grad de dispersie din ce în ce mai mic. Cînd agregatele micelare ating diametre de aproximativ 5 nm ele pătrund în spațiile intervilozitare de la nivelul jejunului proximal și lipidele din structura miceliilor sînt absorbite. Sărurile biliare rămîn în lumen participînd la solubilizarea și transportul altor molecule lipidice. Abia în porțiunea distală a ileonului sărurile biliare sînt absorbite printr-un mecanism activ. Prin sistemul portal sărurile biliare ajung în ficat și după unele remanieri ajung din nou în bilă și intestin (circuite entero-hepatic).

În enterocite producii de hidroliză, totală sau parțială, ai lipidelor servesc la reconstituirea moleculelor inițiale, trigliceride, fosfatide, acil-colesteroli. Căile de sinteză a acestor compuși sînt tratate mai departe. Aceste lipide, unele hidrofobe, altele polare, împreună cu cantități mici de proteine formează particule lipoproteice denumite chilomicroni. Aceste particule sînt secretate de enterocite în vasele chilifere și prin sistemul limfatic ajung în circulația sanguină. Compoziția, transportul și metabolismul chilomicronilor este tratat de asemenea mai departe. Ei reprezintă în esență forma de transport și de distribuire a lipidelor exogene către diversele țesuturi ale organismului.

O cantitate mică din producii digestiei intestinale a lipidelor pătrund în organism prin sistemul portal hepatic. Aceștia sînt acizii grași inferiori, ca acid butiric ( $C_4$ ), acid capronic ( $C_6$ ) care se află în grăsimile din laptele de vacă.

### VIII.3. METABOLISMUL ACIZILOR GRAȘI

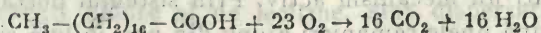
Componentele lipidice majore ale organismelor animale sînt trigliceridele. Sînt molecule energogene și metabolismul lor, degradarea, sinteza, depozitarea și transportul sînt subordonate acestei funcții. Trigliceridele, în condiții normale, acoperă aproximativ 40% din nevoile energetice ale organismului. De fapt acizii grași, care reprezintă aproximativ 90% din greutatea unui triglicerid, au capacitatea de a înmagazina energie și de a o elibera prin ardere. Celelalte categorii de lipide, fosfatide, sfingolipide, colesterol, pe lângă unele roluri structurale strict specifice, participă la vehicularea în cuprinsul organismului a trigliceridelor endogene și exogene.

#### VIII.3.1. DEGRADAREA OXIDATIVĂ A ACIZILOR GRAȘI

Acizii grași formați prin hidroliza trigliceridelor exogene sau a celor endogene eliberează energia chimică potențială înmagazinată în catenele lor hidrocarbonate prin ardere completă la dioxid de carbon și apă. Acizii grași sînt substratul energogen preferat al multor țesuturi, ca miocard, mușchi scheletici.

Creierul nu utilizează direct acizi grași. În inaniție cînd glucoza devine limitantă, în diabet, creierul utilizează ca surse de energie corpii cetonici, care provin din acizi grași. Eritrocitele, care nu au mitocondrii și lanț respirator, de asemenea nu pot utiliza acizii grași.

Arderea acidului palmitic (acidul gras saturat cel mai abundent din organism) are un efect energetic ridicat:



$$\Delta G^\circ = -2\,340 \text{ kcal}$$



Comparativ cu arderea glucozei, acest  $\Delta G^\circ$  este mult mai negativ. Dacă luăm în considerație energia liberă de reacție pentru arderea a 100 g de substanță :

glucoză  $\Delta G = -347 \text{ kcal/100 g}$

acid palmitic  $\Delta G = -914 \text{ kcal/100 g}$

Conținutul caloric mediu al grăsimilor este de 9 kcal/g, față de 4 kcal/g pentru glucide și tot atita pentru proteine.

Arderea acizilor grași în organismele vii este cuplată cu sinteza de ATP, randamentul global al procesului fiind de aproximativ 40%.

Oxidarea completă a unui acid gras se desfășoară în trei etape (fig. VIII.3). Prima etapă,  $\beta$ -oxidare, este specifică catabolismului acizilor grași, pe când celelalte, ciclul acizilor tricarboxilici și lanțul respirator sint căi oxidative terminale comune pentru toți compușii energogeni (glucide, lipide, proteine).

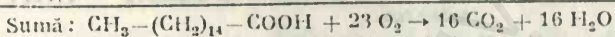
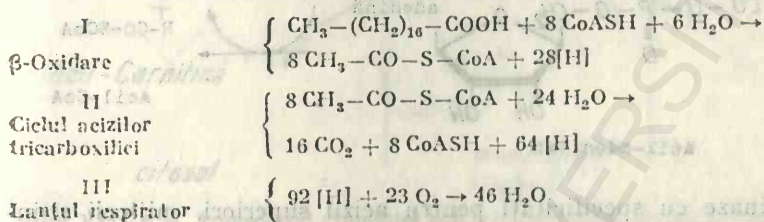


Fig. VIII.3 — Schema arderii acidului palmitic.

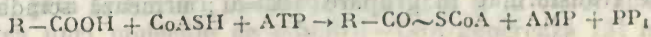
În etapa denumită  $\beta$ -oxidare molecula de acid gras suferă un atac oxidativ la atomul de carbon din poziția  $\beta$ , urmat apoi de desprinderea unui fragment cu doi atomi de carbon sub formă de acetil  $\sim \text{CoA}$ . Prin repetarea de mai multe ori (de 7 ori în cazul acidului palmitic) a secvenței  $\beta$ -oxidative, acidul gras este transformat în  $\frac{n}{2}$  molecule de acetil  $\sim \text{CoA}$  ( $n$  fiind numărul

de atomi de carbon ai acidului gras, un număr par). În această etapă, pe lângă acetil  $\sim \text{CoA}$ , sint-labilizați atomi de hidrogen și transferați pe coenzime.

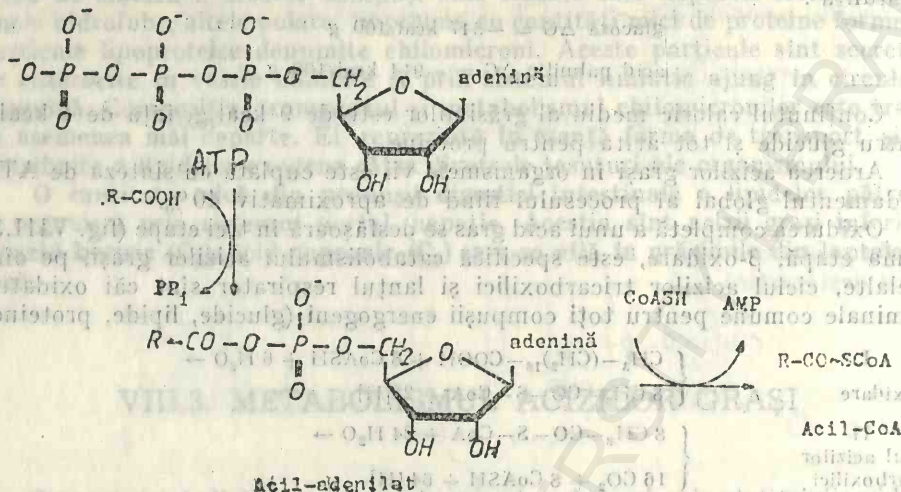
Etapa a doua corespunde degradării oxidative a resturilor acetil în ciclul Krebs cu formare de  $\text{CO}_2$  și coenzime reduse. Procesul se încheie prin oxidarea coenzimelor reduse în lanțul respirator. Prin fosforilări oxidative energia este conservată în ATP. Oxidarea acidului palmitic este cuplată cu sinteza a 129 molecule ATP.  $\beta$ -Oxidarea și reacțiile ciclului Krebs și lanțul respirator sint procese mitocondriale, asociate atât structural cât și funcțional.

### VIII.3.1.1. $\beta$ -Oxidarea acizilor grași (spirală lui Lynen)

**Activarea acizilor grași.** În toate procesele metabolice, fie catabolice, fie anabolice, acizii grași participă ca esteri ai coenzimei A, acil  $\sim \text{CoA}$  sau  $\text{R}-\text{CO} \sim \text{S}-\text{CoA}$ . Activarea are loc în citosol (pe fața citosolică a mitocondriilor) și este catalizată de sintetaze denumite curent tiokinaze :

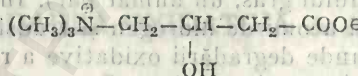


Se formează intermediar un acil-adenilat, după care are loc transferul restului acil pe CoASH:

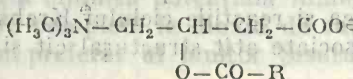


Există tiokinaze cu specificități pentru acizii superiori, mijlocii și inferiori.

**Transferul derivaților acil~CoA în mitocondrii.**  $\beta$ -Oxidarea are loc în matricea mitocondrială iar derivații acil~CoA se formează în citosol. Membrana internă a mitocondriilor, impermeabilă pentru acil~CoA constituie o barieră între cele două compartimente. Resturile acil sunt transferate în matrice prin funcționarea unei navete la care participă carnitina și două acil-transferaze localizate una pe fața externă și alta pe cea internă a membranei. Carnitina,  $\beta$ -hidroxi- $\gamma$ -trimetilamoniu butirat, are formula:



și poate forma esteri, acil-carnitină:



Membrana internă mitocondrială cuprinde o proteină transportatoare (translocază) care transportă cuplat acil-carnitina în matrice și carnitina în sens invers (fig. VIII.4).

**$\beta$ -Oxidarea acil~CoA** constă în repetarea de  $\frac{n}{2} - 1$  a unei secvențe de patru reacții, două dehidrogenări separate de o reacție de hidratare, prin care C $\beta$  este transformat în grupare  $C=O$ ; urmează scindarea legăturii



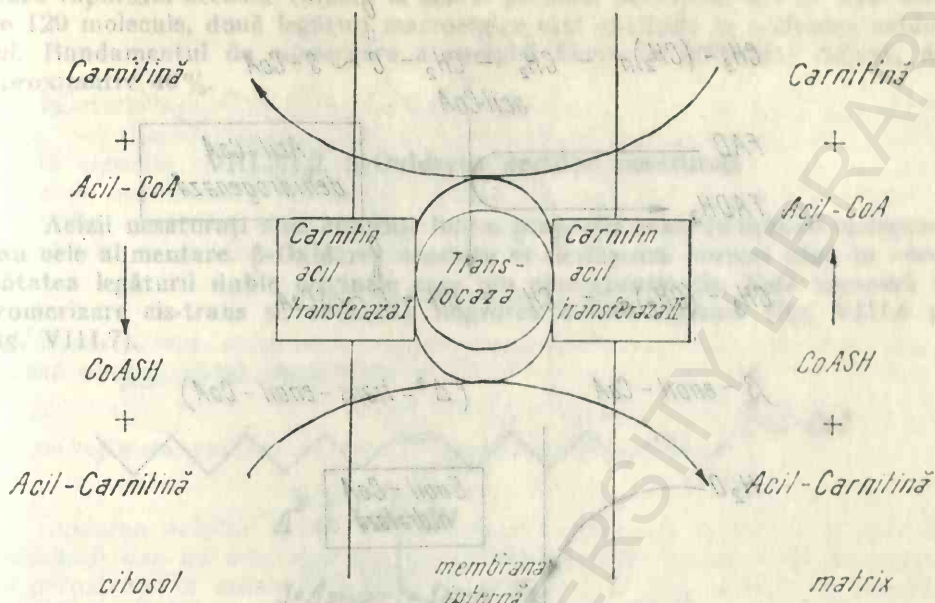
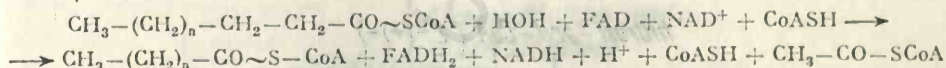
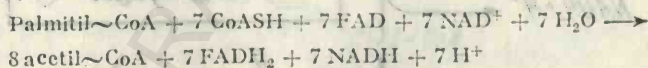


Fig. VIII.4 — Transportul grupărilor acil prin membrana internă a mitocondriilor cu ajutorul carnitinei.

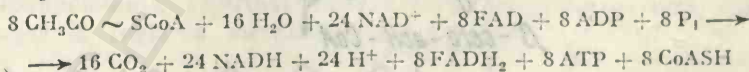
$C\alpha-C\beta$  de către CoASH (tioliză) cu formare de acetil~CoA și un derivat acil~CoA cu doi atomi de carbon mai puțin (fig. VIII.5). Ecuația globală a unui ciclu  $\beta$ -oxidativ este :



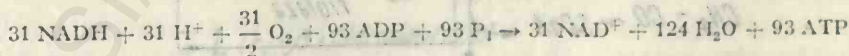
Palmitil-CoA este degradat la acetil~CoA prin repetarea ciclului  $\beta$ -oxidativ de 7 ori :



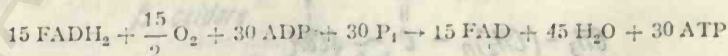
Etapete terminale ale arderii unui acid gras includ ciclul acizilor tricarboxilici și lanțul respirator. Cele opt molecule de acetil~CoA formate prin  $\beta$ -oxidarea palmitil~CoA în ciclul Krebs devin :



Coenzimele  $\text{FADH}_2$  și  $\text{NADH}$  care se formează atât prin  $\beta$ -oxidare cât și în ciclul Krebs sînt oxidate în lanțul respirator cu sinteză cuplată de ATP :



și



În total, prin fosforilări în lanțul respirator și în ciclul acizilor tricarboxilici, arderea unei molecule de palmitil~CoA generează 131 molecule ATP.

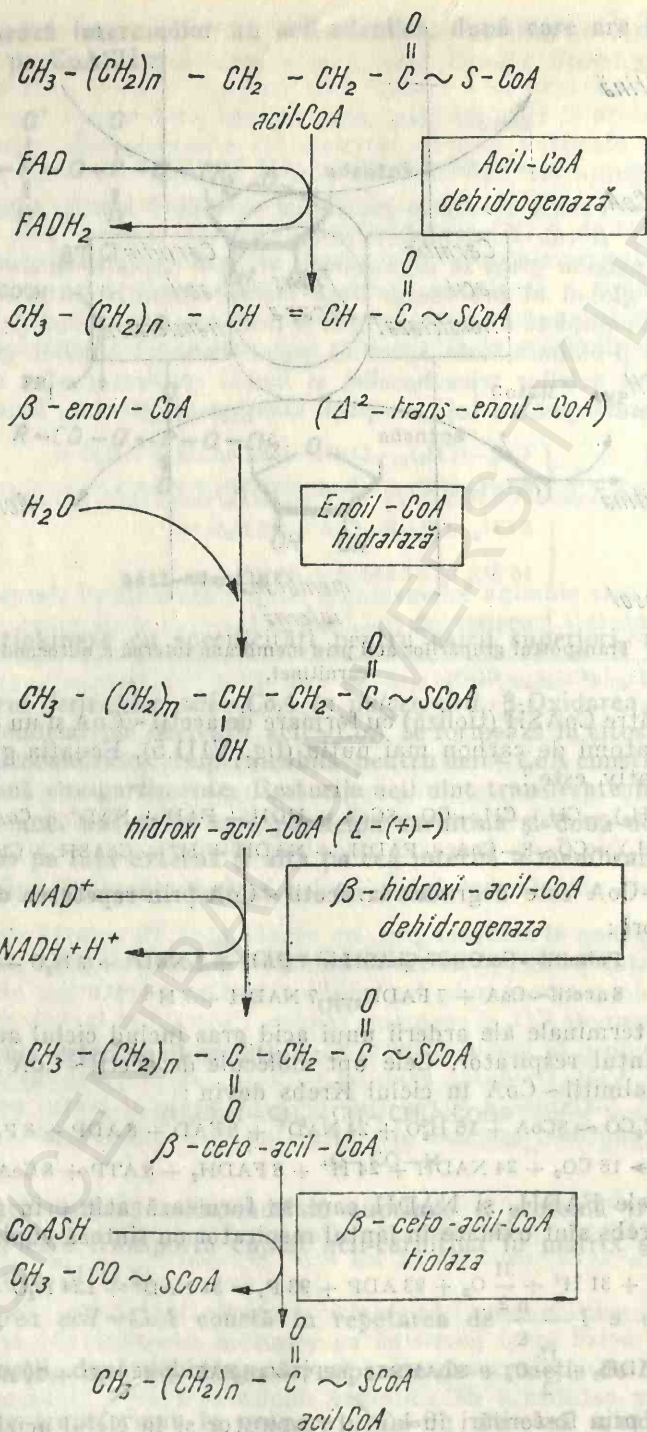


Fig. VIII.5 — β-Oxidarea acil~CoA.



Dacă raportăm această valoare la acidul palmitic beneficiul net în ATP este de 129 molecule, două legături macroergice sînt cheltuite la activarea acidului. Răndamentul de conservare a energiei libere în ATP este ridicat, de aproximativ 40%.

### VIII.3.1.2. $\beta$ -Oxidarea acizilor nesaturați

Acizii nesaturați sînt cuprinși într-o proporție mare în lipidele endogene sau cele alimentare.  $\beta$ -Oxidarea acestora se desfășoară normal pînă în vecinătatea legăturii duble originale care are configurație cis. Este necesară o izomerizare cis-trans și, eventual, migrarea dublei legături (fig. VIII.6 și fig. VIII.7).

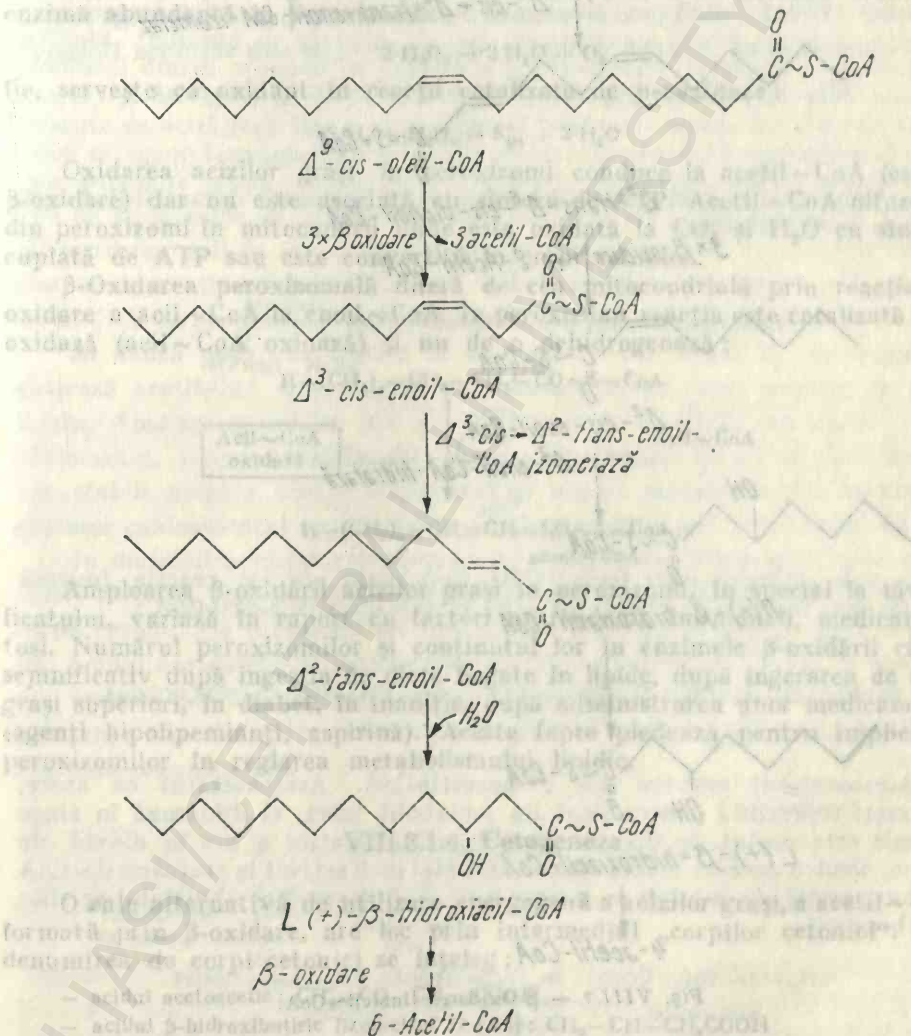


Fig. VIII.6 —  $\beta$ -Oxidarea oileil-CoA.

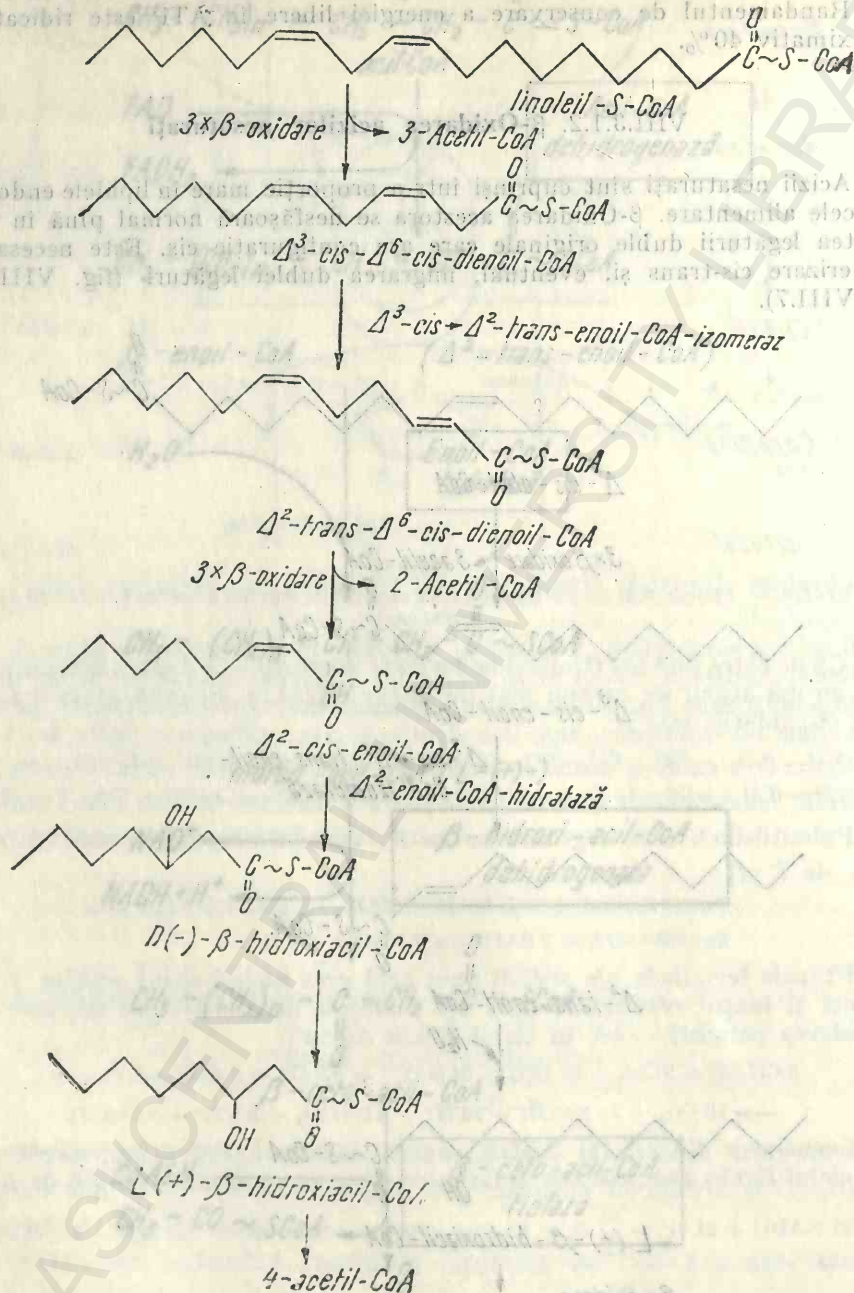
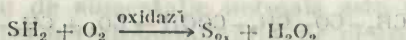


Fig. VIII.7 —  $\beta$ -Oxidarea linoleil~CoA.

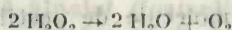


### VIII.3.1.3. Oxidarea acizilor grași în peroxizomi

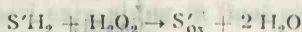
În afara  $\beta$ -oxidării mitocondriale, acizii grași, în special aceia cu catenă lungă, pot fi oxidați la acetil~CoA în peroxizomi (Lazarow și de Duve, 1976). Aceste organite sînt prezente în toate tipurile de celule eucariote, au diametre de aproximativ 0,5 nm și cuprind o membrană simplă. Peroxizomii sînt sediul oxidării multor compuși endogeni sau exogeni, oxidări catalizate de oxidaze cu producție de apă oxigenată:



Mai departe, apa oxigenată este fie descompusă, sub acțiunea catalazei, enzimă abundentă în peroxizomi:

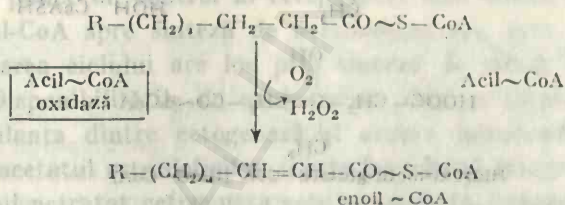


fie, servește ca oxidant în reacții catalizate de peroxidaze:



Oxidarea acizilor grași în peroxizomi conduce la acetil~CoA (este o  $\beta$ -oxidare) dar nu este asociată cu sinteză de ATP. Acetil~CoA difuzează din peroxizomi în mitocondrii unde este oxidată la  $\text{CO}_2$  și  $\text{H}_2\text{O}$  cu sinteză cuplată de ATP sau este convertită în corpi cetonici.

$\beta$ -Oxidarea peroxizomală diferă de cea mitocondrială prin reacția de oxidare a acil~CoA la enoil~CoA. În peroxizomi reacția este catalizată de o oxidază (acil~CoA oxidază) și nu de o dehidrogenază:



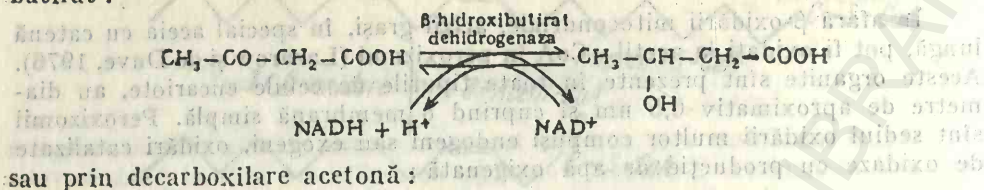
Amplarea  $\beta$ -oxidării acizilor grași în peroxizomi, în special la nivelul ficatului, variază în raport cu factori nutriționali, hormonal, medicamentoși. Numărul peroxizomilor și conținutul lor în enzimele  $\beta$ -oxidării crește semnificativ după ingestia de diete bogate în lipide, după ingerarea de acizi grași superiori, în diabet, în inaniție, după administrarea unor medicamente (agenți hipolipemianți, aspirină). Aceste fapte pledează pentru implicarea peroxizomilor în reglarea metabolismului lipidic.

### VIII.3.1.4. Cetogeneza

O cale alternativă de utilizare energogenă a acizilor grași, a acetil~CoA formată prin  $\beta$ -oxidare, are loc prin intermediul „corpilor cetonici”. Sub denumirea de corpi cetonici se înțeleg:

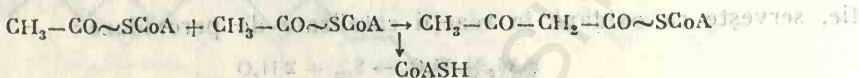
- acidul acetoacetic:  $\text{CH}_3-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{COOH}$
- acidul  $\beta$ -hidroxiutaric [izomerul D (-)]:  $\text{CH}_3-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2\text{COOH}$
- acetona:  $\text{CH}_3-\text{CO}-\text{CH}_3$

Acetoacetatul este produsul primar care dă prin hidrogenare  $\beta$ -hidroxi-butarat :

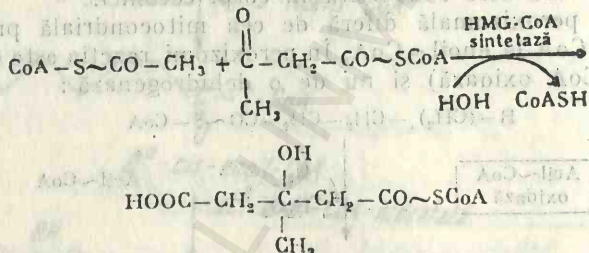


Sinteza de acetoacetat (cetogeneza) are loc în mitocondriile hepatice din acetyl-CoA formată prin  $\beta$ -oxidarea acizilor grași. Procesul decurge astfel :

— condensarea a două molecule de acetyl-CoA sub acțiunea tiolazei :

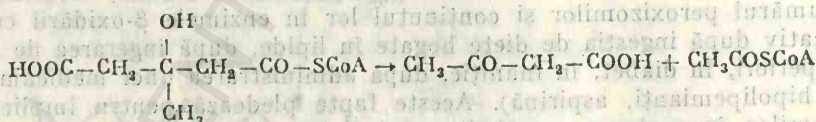


— condensarea acetoacetyl-CoA cu o nouă moleculă de acetyl-CoA sub acțiunea unei sintetaze :

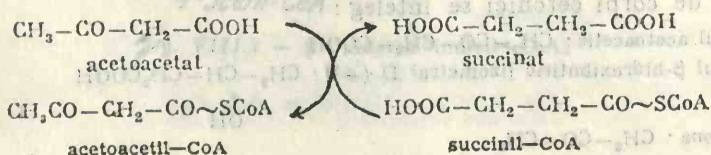


Hidroxi-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA)

— sub acțiunea unei liaze (HMG-CoA-liază) are loc reacția inversă celei de mai înainte cu eliberarea acetoacetatului și a acetyl-CoA :



Acetoacetatul provine din acetoacetyl-CoA. Acetoacetatul ca atare, neactivat, reprezintă pentru ficat un metabolit inert, el difuzează în sînge de unde este captat de diverse țesuturi extrahepatice și ars la dioxid de carbon. Pentru aceasta acetoacetatul este mai întii activat la acetoacetyl-CoA printr-o reacție de schimb cu succinil-CoA (intermediar al ciclului acizilor tricarboxilici) :





apoi este scindat în acetil~CoA sub acțiunea tiolazei:



Acetil~CoA mai departe este oxidată în ciclul Krebs și lanțul respirator. Ficatul nu poate metaboliza acidul acetoacetic (corpii cetonici) întrucît nu posedă echipamentul enzimatic necesar activării acestuia.

Acetoacetatul (și  $\beta$ -hidroxibutiratul) este utilizat energogen de către miocard, mușchii scheletici, diafragm, rinichi, creier etc. Prin cetogeneză creierul devine apt să utilizeze energogen rezervele lipidice ale organismului.

Cetogeneza în condiții de alimentație normală este redusă. Cetonemia nu depășește 1 mg/100 ml. Cînd disponibilitățile de glucoză scad, în foame, diabet, gestație tirzie (nevoile metabolice ale fătului sînt mari), în lactație (se consumă glucoză pentru sinteza lactozei) cetogeneza hepatică este amplificată. Deficitul de glucoză absolut (foame) sau relativ (diabet) perturbă echilibrul dintre procesul de sinteză a trigliceridelor în țesutul adipos (lipogeneză) și hidroliza acestora (lipoliză) cu punerea în circulație de cantități crescute de acizi grași liberi care ajung în ficat unde sînt activați la acil~CoA. Calea cetogenică are un prim punct de răscruce la nivelul distribuției acil~CoA spre  $\beta$ -oxidare (după transfer în mitocondrii via acil-carnitină) sau spre sinteză de trigliceride în citosol. Malonil-CoA (vezi mai departe) inhibă transferul resturilor acil în mitocondrii și blochează  $\beta$ -oxidarea. În condiții cetogenice concentrația malonil-CoA este mică (din lipsă de citrat activator al acetil-CoA carboxilazei) și este favorizată  $\beta$ -oxidarea acil-CoA la acetil-CoA.

Al doilea punct de control al cetogenezei este situat la răscrucea care dirijează acetil-CoA spre sinteză de acetoacetat sau spre oxidare în ciclul Krebs. Amorsarea ciclului are loc prin sinteză de citrat din acetil-CoA și oxaloacetat. Disponibilitățile de oxaloacetat (care se formează din glucoză) vor stabili balanța dintre cetogeneză și ardere mitocondrială. În absența glucozei oxaloacetatul este deficitar și este favorizată cetogeneza (fig. VIII.8).

În diabetul netratat cetogeneza este exacerbată, cetonemia poate atinge valori ridicate, este depășită capacitatea țesuturilor extrahepatice de a arde corpii cetonici (la cetonemii de aproximativ 70 mg/100 ml) și apare cetonuria. Acidul acetoacetic și  $\beta$ -hidroxibutiric sînt eliminați ca săruri, ei consumă din rezerva alcalină a organismului conducînd la acidoză. Totodată fiind substanțe osmotice active antrenează și pierderi mari de apă (poliurie), deshidratarea organismului.

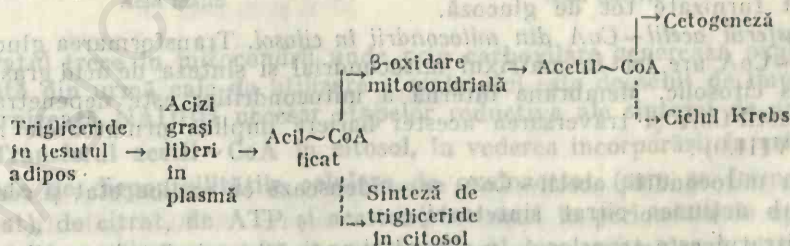


Fig. VIII.8 — Reglarea cetogenezei.

### VIII.3.2. BIOSINTEZA ACIZILOR GRAȘI

Sinteza de acizi grași și incorporarea lor în trigliceride constituie mecanismul principal de stocare a excesului de glucide alimentare. Capacitatea organismului uman de a depozita glucoza ca glicogen este limitată, priso-sul de glucide este într-o măsură considerabilă convertit în acizi grași, respectiv, trigliceride și depozitate în țesutul adipos. Atomii de carbon din acizii grași sînt furnizați de acetyl-CoA formată din glucoză prin glicoliză la piruvat urmată de decarboxilarea oxidativă a acestuia din urmă. Acizii grași au număr par de atomi de carbon, ei rezultă prin legarea cap-coadă a unităților  $C_2$  furnizate de acetyl-CoA.

Sinteza de acizi grași mai are și rolul de a furniza organismului întreaga gamă de acizi din structura lipidelor.

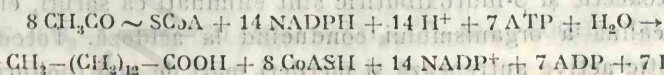
Biosinteza acizilor grași cuprinde mai multe procese:

- sinteza „de novo” cu formare de acid palmitic;
- elongarea acidului palmitic nou sintetizat sau a unor acizi grași endogeni sau exogeni;
- introducerea de legături duble în acizi grași endogeni sau exogeni.

#### VIII.3.2.1. Biosinteza acidului palmitic

Aparatul de sinteză de novo conduce la acid palmitic de la care prin elongarea catenei și/sau introducerea de legături duble se obțin alți acizi grași, acid stearic, acid palmitic, acid oleic, acid lignoceric etc.

Sinteza acidului palmitic are loc în citosol cu participarea unei proteine multienzimatice — acid gras sintetază. Majoritatea țesuturilor dispun de acest echipament, totuși ficatul deține rolul principal în sinteza de novo a acizilor grași. Acetyl-CoA rezultă din glucoză. Procesul este intens reductiv (necesită NADPH) și endergonic (necesită ATP). Ecuația globală a biosintezei acidului palmitic este:



Puterea reductoare sub formă de NADPH și energia sub formă de ATP sînt furnizate tot de glucoză.

▲ *Transferul acetyl-CoA din mitocondrii în citosol.* Transformarea glucozei în acetyl-CoA are loc în matrixul mitocondrial și sinteza de acid gras este un proces citosolic. Membrana internă a mitocondriilor este nepenetrabilă pentru acetyl-CoA și traversarea acestei bariere implică următoarele reacții (fig. VIII.9):

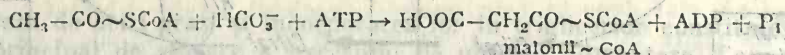
— în mitocondrii, acetyl-CoA se condensează cu oxaloacetat și rezultă citrat (sub acțiunea citrat sintetazei);

— citratul este translocat în citosol și apoi este scindat în acetyl-CoA și oxaloacetat într-o reacție ATP-dependentă (sub acțiunea citrat liazei);





♥ **Sinteza malonil ~ CoA.** Deși acetil ~ CoA furnizează toți atomii de carbon din acidul palmitic totuși procesul de biosinteză necesită obligatoriu dioxid de carbon ( $\text{HCO}_3^-$ ). Acesta din urmă carboxilează acetil ~ CoA la malonil ~ CoA:



sub acțiunea acetil ~ CoA carboxilazei (carboxiligază), o biotin-enzimă. Reacția are loc în două etape:

- a) biotin-enzimă +  $\text{HCO}_3^-$  + ATP → carboxi-biotin-enzimă + ADP +  $\text{P}_i$
- b) carboxi-biotin-enzimă + acetil ~ CoA → malonil ~ CoA + biotin-enzimă

Carboxilarea acetil ~ CoA este etapa reglatoare a biosintezei acidului palmitic. Acetil ~ CoA carboxilaza este activată de citrat și inhibată de derivații acil ~ CoA cu catenă lungă.

**Acid gras-sintetaza.** Sinteza acidului palmitic are loc sub acțiunea unui complex multienzimatic — acid gras-sintetază — alcătuit din opt proteine (sau domenii). Dintre acestea, șapte sînt proteine catalitice: acetil (acil) transacilază, malonil transacilază,  $\beta$ -cetoacil-sintetază,  $\beta$ -cetoacil reductază,  $\beta$ -hidroxiacil-dehidratază, enoil-reductază, tioesterază. Cea de a opta proteină a complexului este proteina transportatoare de acil (ACP = acyl carrier protein) care cuprinde fosfopanteteină atașată prin legătură fosfat-serină. De gruparea — SH a ACP sînt fixați ca tioesteri intermediari acili.

Complexul multienzimatic mai cuprinde o grupare — SH furnizată de un rest cisteinil din  $\beta$ -cetoacil-sintetază.

Acid gras-sintetaza funcționează sub forma unui dimer, gruparea ACP—SH a unui monomer conlucrează cu gruparea Cis—SH a celuilalt monomer (fig. VIII.10).

Sinteza acidului palmitic cuprinde următoarele etape (fig. VIII.11):

- a) transferul unui rest acetil (sau acil în cursul elongării) pe gruparea Cis—SH;
- b) transferul unui rest malonil pe gruparea ACP—SH;
- c) atacul restului acetil (sau acil) asupra grupării malonil în urma căruia are loc decarboxilarea și formarea  $\beta$ -ceto-acil-S-ACP;
- d) reducerea restului  $\beta$ -ceto-acil la  $\beta$ -hidroxi-acil;
- e) deshidratarea restului  $\beta$ -hidroxi-acil la enoil;
- f) hidrogenarea restului enoil- la acil.

Acest ciclu de reacții este reluat după transferul restului acil pe gruparea Cis—SH. Catena acidului gras crește pînă se obține palmitil-S-ACP.

g) Ultima reacție a procesului este detașarea hidrolică a acidului palmitic sub acțiunea tioesterazei.

### VIII.3.2.2. Elongarea acizilor grași

Sinteza de novo prin acid gras sintetază duce la formarea acidului palmitic. Acizii superiori sînt obținuți prin elongarea acidului palmitic sau la altor acizi exogeni. Deși există un sistem de elongare mitocondrial care funcționează, în esență, prin inversarea reacțiilor  $\beta$ -oxidării, la mamifere



Fig. VIII.10 — Acid gras-sintetază (dimer).

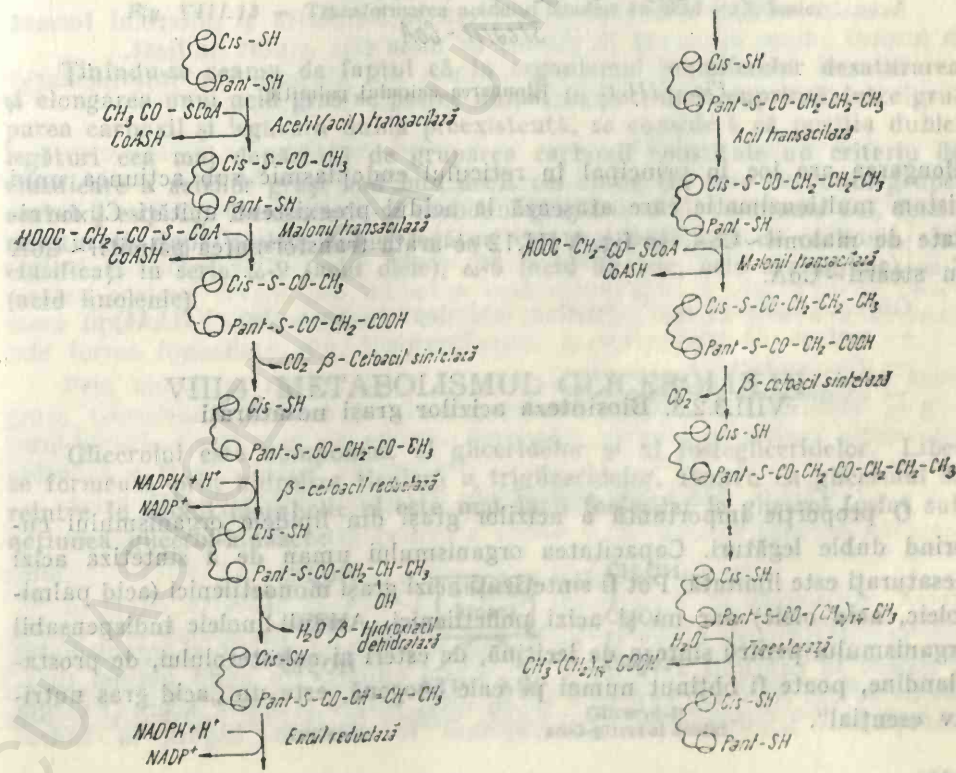
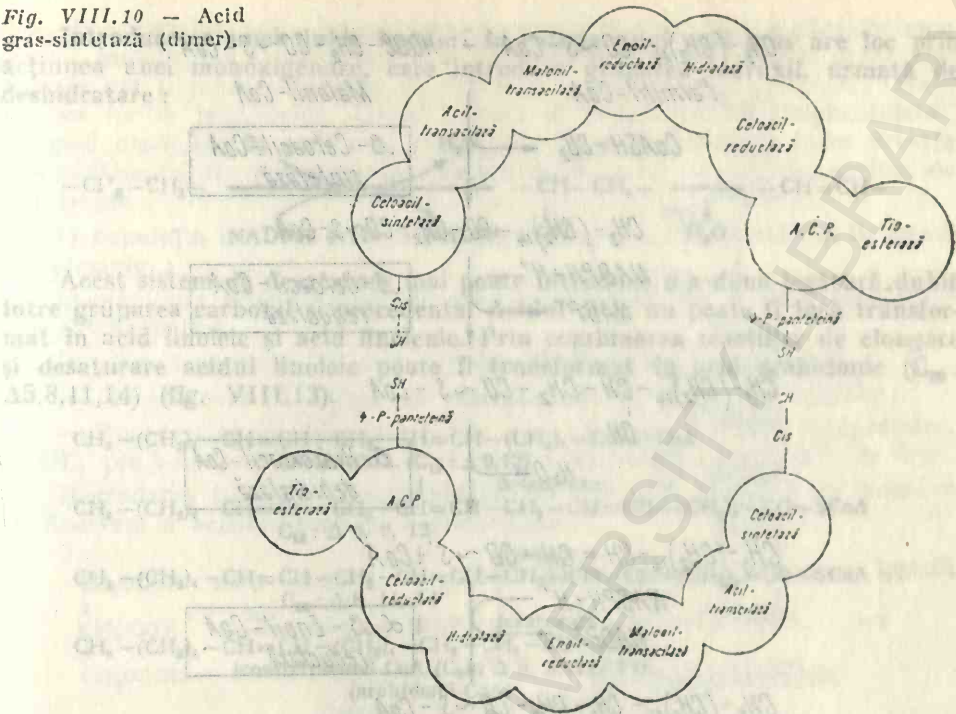


Fig. VIII.11 — Biosinteza acidului palmitic.

$\text{O-Cis-SH}$   
 $\text{O-Pant-SH} = \text{Acid gras-sintetază}$

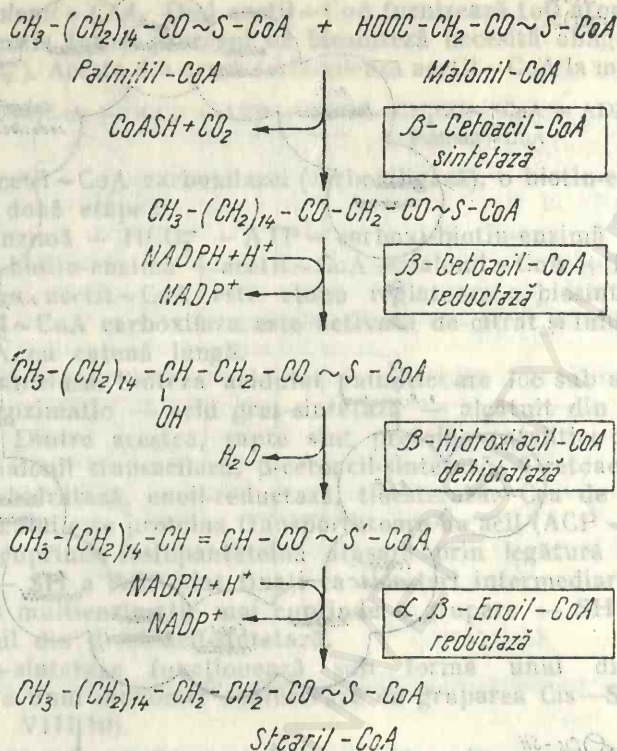


Fig. VIII.11. Elongarea acidului palmitic.

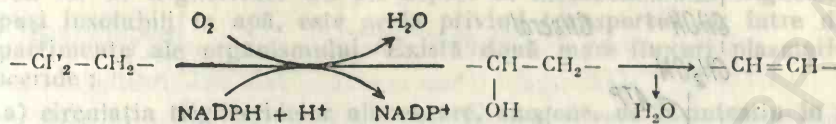
elongarea are loc în principal în reticulul endoplasmic sub acțiunea unui sistem multienzimatic care atașează la acidul preexistent unități  $\text{C}_2$  furnizate de malonil~CoA. În fig. VIII.12 se arată transformarea palmitil~CoA în stearil~CoA.

### VIII.3.2.3. Biosinteza acizilor grași nesaturați

O proporție importantă a acizilor grași din lipidele organismului cuprind duble legături. Capacitatea organismului uman de a sintetiza acizi nesaturați este limitată. Pot fi sintetizați acizi grași monoetilenici (acid palmiteic, acid oleic) dar nu și acizi polietilenici. Acidul linoleic indispensabil organismului pentru sinteza de lecitină, de esterii ai colesterolului, de prostaglandine, poate fi obținut numai pe cale exogenă, este un „acid gras nutritiv esențial“.



Introducerea unei duble legături în catena unui acid gras are loc prin acțiunea unei monoxigenaze, care introduce gruparea hidroxil, urmată de deshidratare :



Acest sistem de desaturare mai poate introduce o a doua legătură dublă între gruparea carboxil și precedenta. Acidul oleic nu poate fi însă transformat în acid linoleic și acid linolenic. Prin combinarea reacțiilor de elongare și desaturare acidul linoleic poate fi transformat în acid arahidonic ( $\text{C}_{20}$ :  $\Delta 5,8,11,14$ ) (fig. VIII.13).

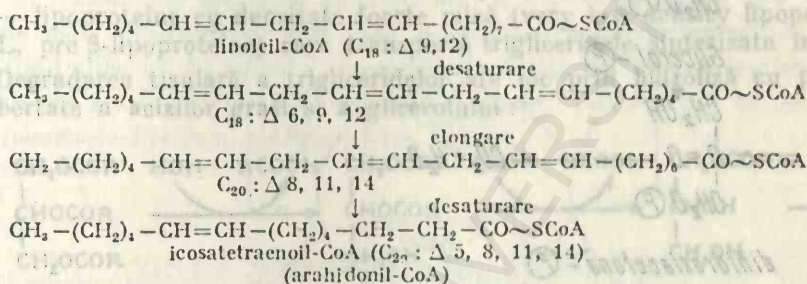


Fig. VIII.13 — Transformarea acidului linoleic în acid arahidonic.

Tinându-se seama de faptul că în organismul mamiferelor desaturarea și elongarea unui acid gras se petrec numai în porțiunea cuprinsă între gruparea carboxil și legătura dublă preexistentă, se consideră că poziția dublei legături cea mai depărtată de gruparea carboxil constituie un criteriu de clasificare a acizilor grași mai bun decât cel clasic (în care carbonul grupei carboxil este  $\text{C}_1$ ). Denumindu-se carbonul grupării metil terminale  $\text{C}_\omega$ , acizii, nesaturați, după poziția dublei legături cea mai depărtată de carboxil, sînt clasificați în seria  $\omega$ -9 (acid oleic),  $\omega$ -6 (acid linoleic, acid arahidonic),  $\omega$ -3 (acid linolenic).

#### VIII.4. METABOLISMUL GLICEROLULUI

Glicerolul este component al gliceridelor și al fosfogliceridelor. Liber se formează prin hidroliza tisulară a trigliceridelor. Pentru ca glicerolul să reentre în fluxul metabolic el este mai întîi fosforilat la glicerol fosfat sub acțiunea glicerol-kinazei :

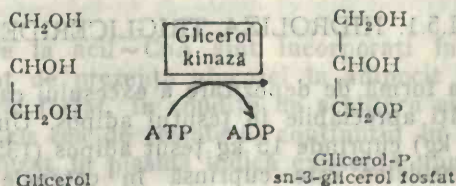
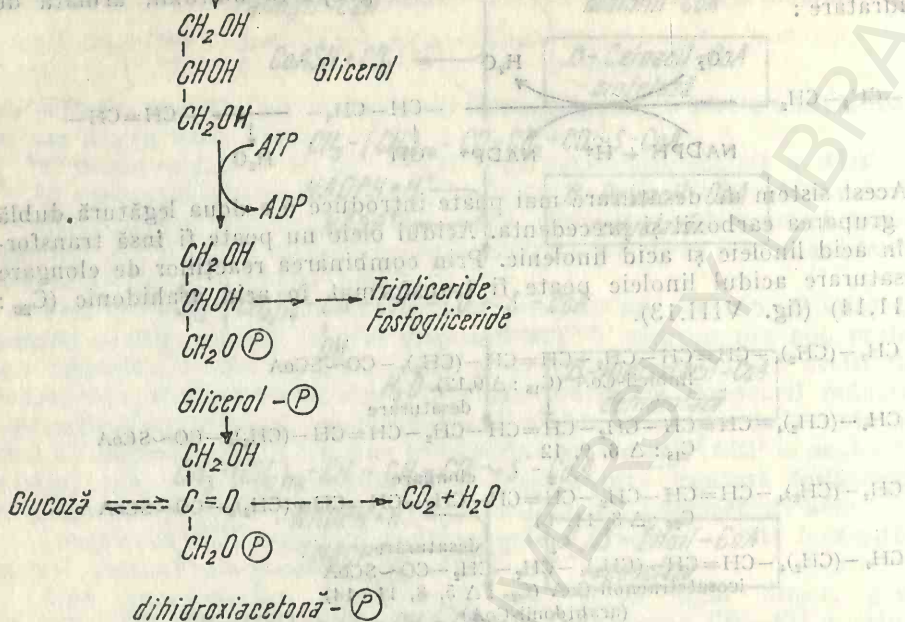
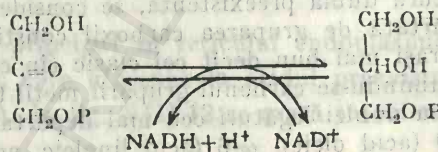


Fig. VIII.14 — Metabolismul glicerolului.



Această enzimă este practic absentă în adipocite și glicerolul format în țesutul adipos difuzează în plasmă de unde este captat de ficat. Glicerol fosfatul mai poate fi obținut din glucoză, din intermediarul glicolitic dihidroxiacetona fosfat, prin reacția reversibilă:



Glicerol fosfatul poate evolua mai departe spre (fig. VIII.14):

- sinteză de trigliceride și fosfogliceride;
- gluconeogeneneză
- oxidare la  $\text{CO}_2$  și apă.

## VIII.5. METABOLISMUL TRIGLICERIDELOR

### VIII.5.1. HIDROLIZA TRIGLICERIDELOR

Trigliceridele ca formă de depozitare a excesului caloric al organismului se găsesc în cantități apreciabile în țesutul adipos. Un adult normal (bărbat de 40 ani și 70 kg) cuprinde 15 kg țesut adipos (135 000 kcal). Energia potențială a trigliceridelor este cuprinsă în catenele bogate în hidro-



gen ale resturilor acil. În paragraful precedent s-a tratat modul în care are loc mobilizarea acestei energii și cum are loc sinteza acizilor grași. Mai departe vor fi prezentate căile de eliberare a acizilor grași, respectiv încorporarea lor în trigliceride. Un alt aspect al metabolismului trigliceridelor, compuși insolubili în apă, este acela privind transportul lor între diverse compartimente ale organismului. Există două mari fluxuri plasmatice de trigliceride :

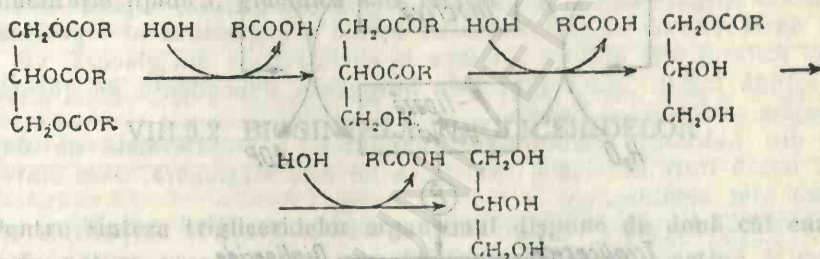
a) circulația trigliceridelor alimentare, exogene, de la intestin în restul organismului ;

b) circulația trigliceridelor de origine endogenă de la ficat spre țesuturi extrahepatice.

În plasmă trigliceridele sunt cuprinse în particule lipoproteice :

- chilomicroni ca formă de transport a trigliceridelor exogene ;
- lipoproteine cu densitate foarte mică (very low density lipoproteins, VLDL, pre  $\beta$ -lipoproteine) care transportă trigliceridele sintetizate în ficat.

Degradarea tisulară a trigliceridelor are loc prin hidroliză cu punerea în libertate a acizilor grași și a glicerolului :



Prima etapă este cea mai lentă și de aceea mono- și digliceridele nu se acumulează. Această reacție este catalizată de enzime denumite triglicerid-laze. Cea mai importantă este triglicerid lipaza din țesutul adipos răspunzătoare de mobilizarea rezervelor lipidice ale organismului (lipoliza). Este reglată hormonal și mai este cunoscută ca „lipaza hormon-sensibilă“. Activitatea enzimei crește sub influența catecolaminelor, a glucagonului (hormoni lipolitici). Activarea este mediată de  $\text{AMP}_c$ , forma activă a enzimei este forma fosforilată (fig. VIII.15).

Prin hidroliza trigliceridelor în țesutul adipos rezultă glicerol și acizi grași. Glicerolul difuzează în plasmă, țesutul adipos fiind deficitar în glicerol-kinază. Cantitatea de glicerol plasmatic permite estimarea vitezei de hidroliză a trigliceridelor adipocitare.

Acizii grași pot fi utilizați pe mai multe căi.

a) O porțiune este arsă pentru a obține ATP necesar funcției adipocitului.

b) După activare la acil~CoA sunt încorporați în trigliceride. Acest proces este dependent de prezența glucozei în adipocit (și de insulinemie) care furnizează glicerol fosfat. În condiții de echilibru caloric viteza de hidroliză devine egală cu cea de resinteză, conținutul în trigliceride rămâne același. Glicerolul difuzat în plasmă indică existența unui proces hidrolitic.

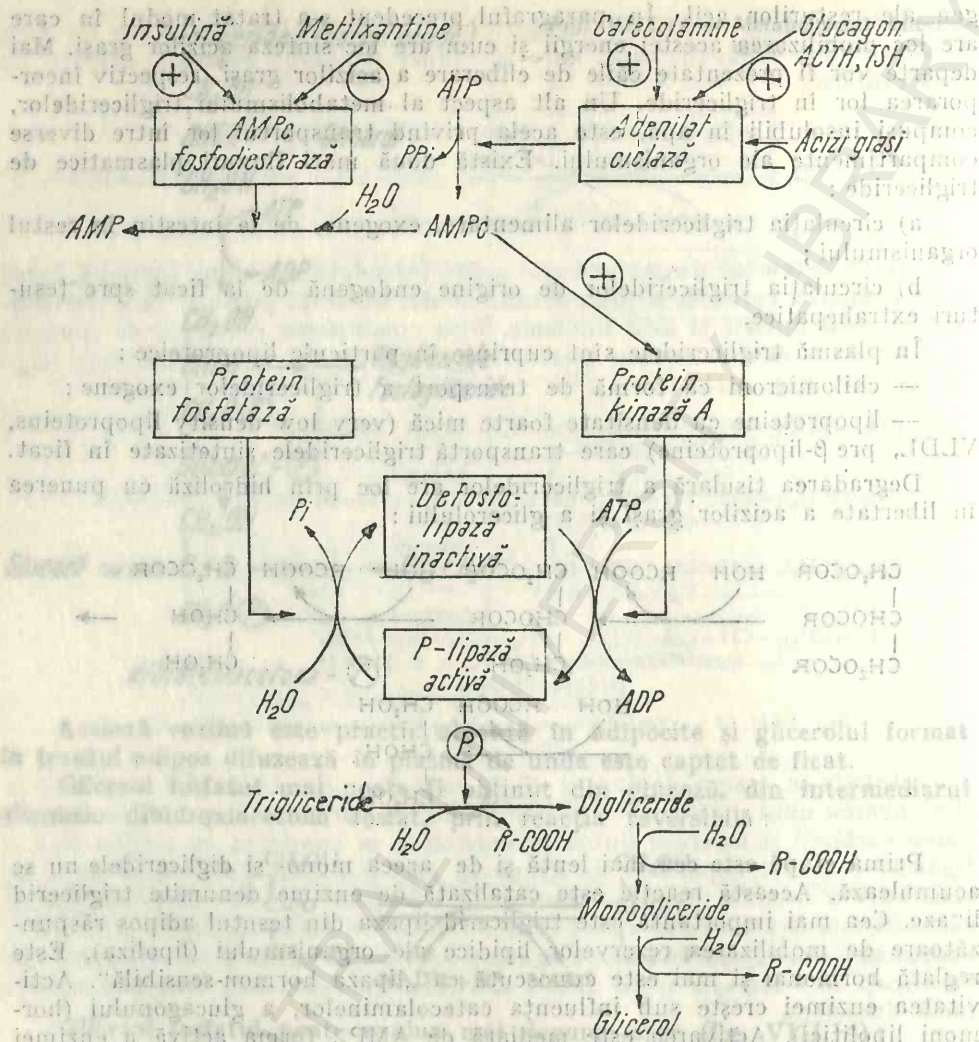


Fig. VIII.15 — Reglarea activității lipazei hormon sensibilă.

c) Acizii grași sînt eliberați în plasmă, constituind fracțiunea „acizi grași liberi” (AGL, acizi grași neesterificați). Tesuturile periferice — mușchi scheletici, miocard, diafragm, rinichi, ficat — captează din plasmă acizi grași utilizându-i ca substrat energogen.

La trecerea de la starea de hrănire la cea de foame, de post, concentrația acizilor grași liberi plasmatici crește de la 0,3 nmol/ml la 0,8 nmol/ml. De asemenea stresurile fizice sau psihice conduc la eliberarea de catecolamine, hormoni lipolitici, cu intensificarea hidrolizei de trigliceride și eliberare în plasmă de acizi grași. În inanție (din cauza deficitului de glucoză) și în diabet (din cauza insuficienței sau ineficienței insulinei) echilibrul dintre hidroliza și resinteza trigliceridelor adipocitare este perturbat, balanța



se înclină spre lipoliză. Concentrația acizilor grași liberi din plasmă depășește nevoile energetice ale țesuturilor periferice. Ficatul epurează plasma de excesul de acizi grași transformându-i în parte în trigliceride și în parte în corpi cetonici.

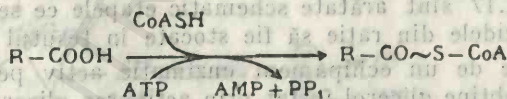
**Hidroliza trigliceridelor plasmatice.** Principalele forme de vehiculare plasmatică a trigliceridelor sînt chilomicronii și lipoproteinele cu densitate foarte mică (VLDL). Aceste particule nu pot penetra membranele plasmatice, ele pierd încălețura de trigliceride numai prin hidroliza acestora din urmă și produșii hidrolizei sînt reținuți în țesuturi. Hidroliza trigliceridelor din chilomicroni și VLDL este catalizată de lipoproteinlipază. Enzima din țesutul adipos joacă un rol esențial în utilizarea trigliceridelor alimentare (prezente în plasmă sub formă de chilomicroni) și a celor endogene (din VLDL). Enzima este localizată pe suprafața luminală a endoteliului capilar, acizii grași fiind eliberați în adipocit. În circulație ajung cantități neînsemnate din acești acizi grași. Activitatea lipoprotein lipazei este crescută în perioadele de alimentație lipidică, glucidică sau mixtă.

## VIII.5.2. BIOSINTEZA TRIGLICERIDELOR

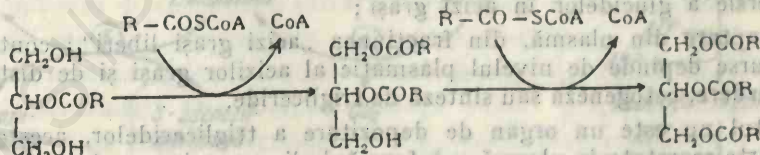
Pentru sinteza trigliceridelor organismul dispune de două căi care diferă prin natura precursorului care furnizează glicerolul activ:

- a) calea monogliceridelor;
- b) calea glicerol fosfatului;

Acizii grași sînt incorporați în trigliceride sub formă activă, de acil ~ CoA:

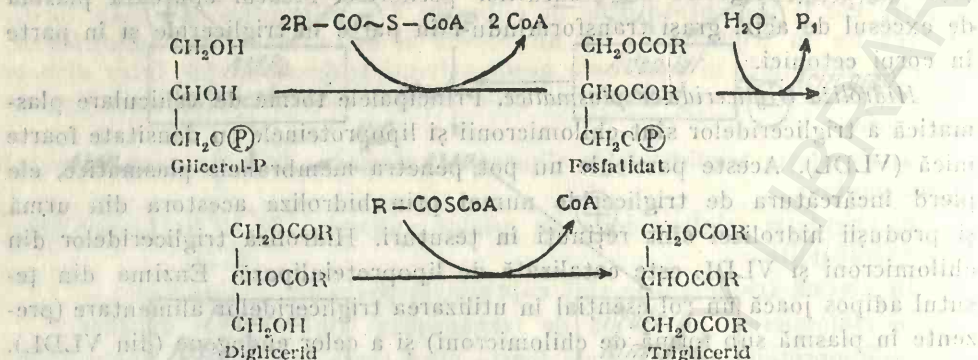


Calea monogliceridelor funcționează în enterocite și reprezintă o modalitate rapidă și economică de resinteză a trigliceridelor din produșii de digestie:



Trigliceridele astfel sintetizate, împreună cu colesterol liber și esterificat, fosfolipide și proteine, sînt incorporate în particule lipoproteice denumite chilomicroni și trecute în circulație, via sistemul limfatic.

Calea glicerol fosfatului este operațională în celelalte țesuturi:



Aproape toate țesuturile sintetizează trigliceride pentru nevoi proprii. Totuși sinteza trigliceridelor în țesutul adipos și în ficat joacă un rol general în economia energetică a organismului.

Sinteza trigliceridelor în țesutul adipos (lipogeneza) reprezintă modalitatea de stocare a excesului caloric, lipidic sau glucidic, al organismului. Glicerol fosfatul este obținut aproape în exclusivitate din glucoză, via dihidroxiacetonă fosfat. Acest fapt face lipogeneza dependentă de glicemie și insulinemie. Acizii grași provin:

- din hidroliza trigliceridelor adipocitare; trigliceridele de depozit se află într-o stare dinamică, cantitatea lor este staționară, dacă sinteza și hidroliza sînt echilibrate;
- sinteza de novo (din glucoză) a acizilor grași în adipocitele umane este foarte redusă, practic neglijabilă;
- din hidroliza trigliceridelor plasmatiche cuprinse în chilomicroni (care transportă trigliceridele exogene) și în lipoproteinele cu densitate foarte mică (care transportă trigliceridele endogene); această ultimă sursă de acizi grași duce la un câștig net de trigliceride adipocitare, de constituire a depozitului caloric pe seama excesului de lipide și/sau glucide alimentare. În fig. VIII.16 și fig. VIII.17 sînt arătate schematic etapele ce se parcurg pentru ca grăsimile și glucidele din rație să fie stocate în țesutul adipos.

Ficatul dispune de un echipament enzimatic activ pentru sinteză de trigliceride. Poate obține glicerol fosfat prin activarea glicerolului captat din sînge și din glucoză.

Acizii grași incorporați în trigliceridele hepatice provin:

- prin sinteză „de novo” din glucoză; ficatul este principalul organ de conversie a glucidelor în acizi grași;
- captare din plasmă, din fracțiunea „acizi grași liberi”; contribuția acestei surse depinde de nivelul plasmatic al acizilor grași și de distribuția lor spre ardere, cetogeneză sau sinteză de trigliceride.

Ficatul nu este un organ de depozitare a trigliceridelor, acestea sînt mai departe secretate în plasmă sub formă de lipoproteine cu densitate foarte mică (VLDL). Țesuturile extrahepatice dotate cu lipoprotein lipază hidrolizează trigliceridele din VLDL și rețin acizii grași. Țesutul adipos reincorporează acești acizi grași în trigliceridele pe care le depozitează (fig. VIII.17).



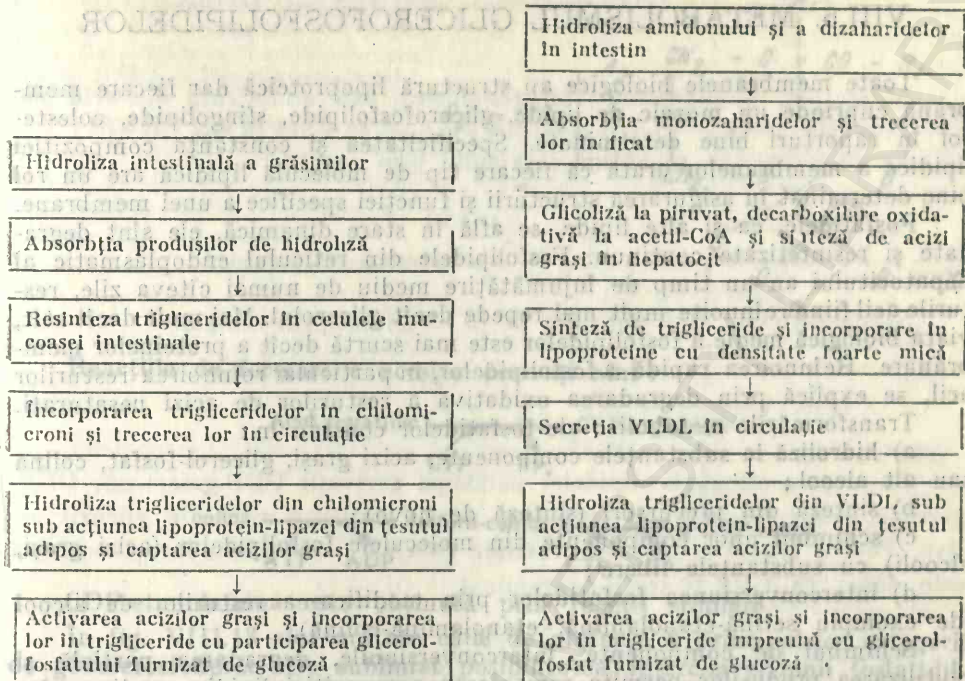


Fig. VIII.16 — Circuitul grăsimilor exogene în organism.

Fig. VIII.17 — Circuitul glucidelor exogene în organism până la constituirea depozitului de grăsimi adipocitare.

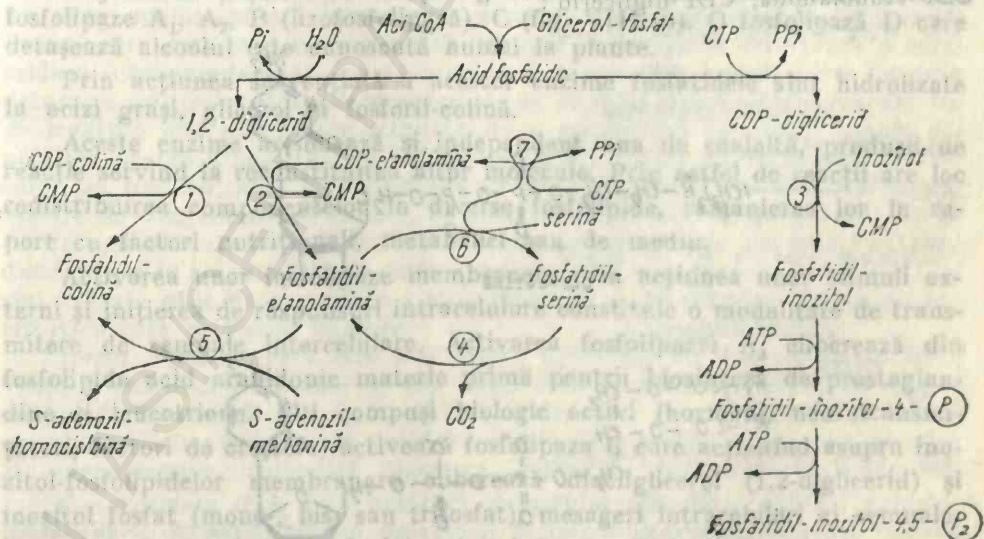


Fig. VIII.18 — Metabolismul fosfatidelor.

## VIII.6. METABOLISMUL GLICEROFOSFOLIPIDELOR

Toate membranele biologice au structură lipoproteică dar fiecare membrană cuprinde un mozaic de lipide, glicerofosfolipide, sfingolipide, colesterol în raporturi bine determinate. Specificitatea și constanța compoziției lipidice a membranelor arată că fiecare tip de moleculă lipidică are un rol bine determinat în asigurarea structurii și funcției specifice a unei membrane.

Fosfatidele, ca și alte lipide, se află în stare dinamică, ele sînt degradate și resintetizate continuu. Fosfolipidele din reticulul endoplasmatic al hepatocitului au un timp de înjumătățire mediu de numai cîteva zile, resturile acil fiind reinnoite mult mai repede decît glicerolul. Mai mult decît atît, viața biologică medie a fosfolipidelor este mai scurtă decît a proteinelor membranare. Reînnoirea rapidă a fosfolipidelor, în particular reînnoirea resturilor acil, se explică prin degradarea oxidativă a resturilor de acizi nesaturați.

Transformările metabolice ale fosfatidelor constau în:

- hidroliză la substanțele componente, acizi grași, glicerol-fosfat, colină sau alt alcool;
- sinteză din precursori (sinteză de novo);
- schimbul unor componente din moleculele fosfolipidelor (acizi grași, alcooli) cu substanțele libere;
- interconversiunea fosfatidelor prin modificarea resturilor de alcool (de exemplu serină-etanolamină, etanolamină-colină).

Schimbul de componente, interconversiunile, degradarea parțială și reutilizarea produșilor permite remanierea compoziției lipidice a diverselor membrane, asigurîndu-se pentru fiecare tip compoziția sa specifică.

Sinteza de novo a glicerofosfolipidelor utilizează ca intermediar comun acidul fosfatidic, obținut așa cum s-a arătat la biosinteza trigliceridelor. O particularitate a biosintezei fosfatidelor este participarea unor precursori în forme active de derivați ai citidin difosfatului (CDP) ca CDP-colină, CDP-etanolamină, CDP-glicerid:

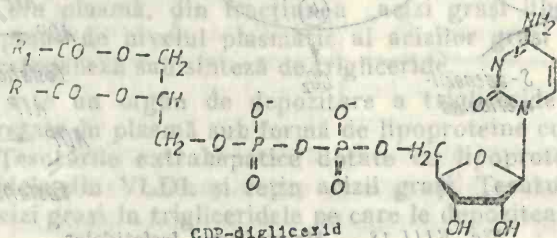
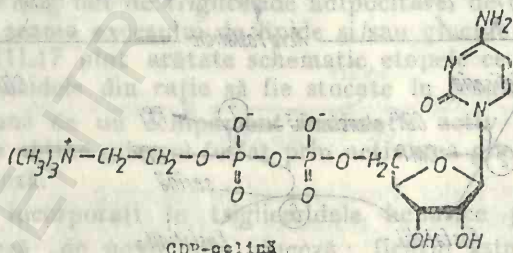
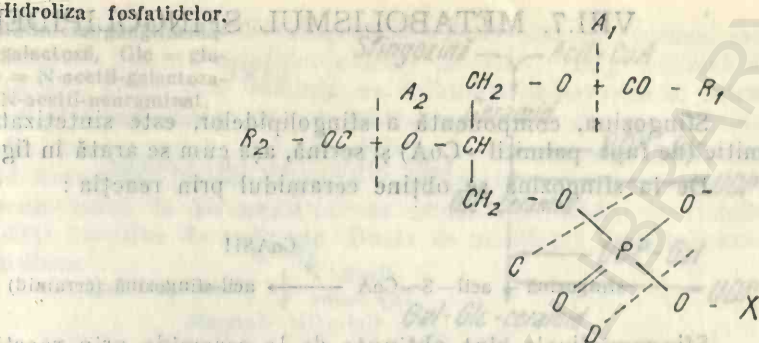
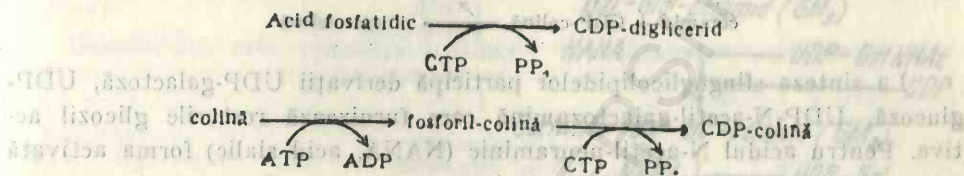




Fig. VIII.19 — Hidroliza fosfatidelor.



Reacțiile de formare a acestor derivați sint :



CDP-etanolamina este obținută prin reacții similare.

În fig. VIII.18 sint arătate căile de obținere a principalelor categorii de glicerofosfolipide. De subliniat posibilitatea interconversiunii fosfatidil-etanolamină  $\rightarrow$  fosfatidil-serină prin schimbul dintre serină liberă și fosfatidil-etanolamină (reacția 6), ca și trecerea fosfatidil-serină  $\rightarrow$  fosfatidil-etanolamină prin decarboxilare (reacția 4); prin metilare restul de etanolamină este transformat în rest de colină (reacția 5). Donorul de grupări metil este S-adenozil-metionina (metionina activă).

**Degradarea fosfatidelor.** Asupra glicerofosfolipidelor acționează diverse fosfolipaze A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B (lizofosfolipază), C (fig. VIII.19). O fosfolipază D care detașează alcoolul este cunoscută numai la plante.

Prin acțiunea secvențială a acestor enzime fosfatidele sint hidrolizate la acizi grași, glicerol și fosforil-colină.

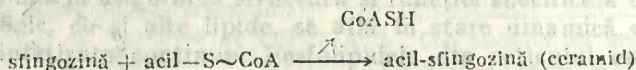
Aceste enzime acționează și independent una de cealaltă, produșii de reacție servind la reconstituirea altor molecule. Prin astfel de reacții are loc redistribuirea componentelor în diverse fosfolipide, remanierea lor în raport cu factori nutriționali, metabolici sau de mediu.

Activarea unor fosfolipaze membranare prin acțiunea unor stimuli externi și inițierea de răspunsuri intracelulare constituie o modalitate de transmitere de semnale intercelulare. Activarea fosfolipazei A<sub>2</sub> eliberează din fosfolipide acid arahidonic materie primă pentru biosinteza de prostaglandine și leucotriene. Alți compuși biologic activi (hormoni, neurotransmițători, factori de creștere) activează fosfolipaza C care acționind asupra inozitol-fosfolipidelor membranare eliberează diacilglicerol (1,2-diglicerid) și inozitol fosfat (mono-, bis- sau trifosfat), mesageri intracelulari ai semnalelor extracelulare (vezi capitolul privind hormonii).

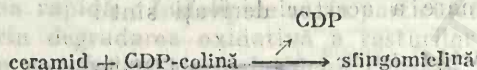
## VIII.7. METABOLISMUL SFINGOLIPIDELOR

Sfingozina, componentă a sfingolipidelor, este sintetizată din acid palmitic (de fapt palmitil~CoA) și serină, așa cum se arată în fig. VIII.20 :

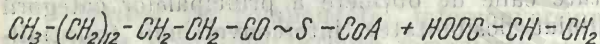
De la sfingozină se obține ceramidul prin reacția :



Sfingomielinele sînt obținute de la ceramide prin reacția :



La sinteza sfingoglicolipidelor participă derivații UDP-galactoză, UDP-glucoză, UDP-N-acetil-galactozamină care furnizează resturile glicozil active. Pentru acidul N-acetil-neuraminic (NANA, acid sialic) forma activată este aceea de CMP-N-acetil-neuraminat.

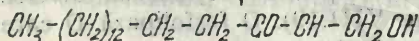


palmitil-CoA

NH  
serină

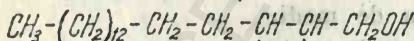
CoASH  
CO<sub>2</sub>

Piridoxal-P



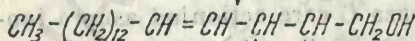
3-ceto-dihidrosfingozină

NADPH + H<sup>+</sup>  
NADP<sup>+</sup>



dihidrosfingozină

FADH<sub>2</sub>  
FAD

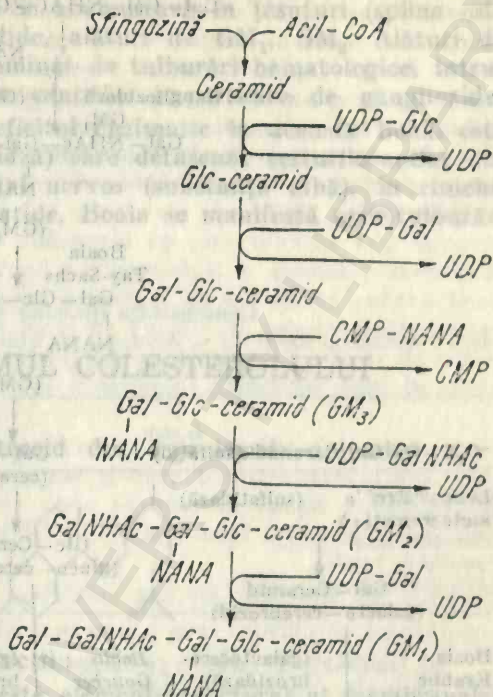


sfingozină

Fig. VIII.20 — Biosinteza sfingozinei.



Fig. VIII.21 — Biosinteza ganglioizidului  $GM_1$ ; Gal = galactoză, Glc = glucoză, Gal-NHAc = N-acetil-galactozamină, NANA = N-acetil-neuraminat.

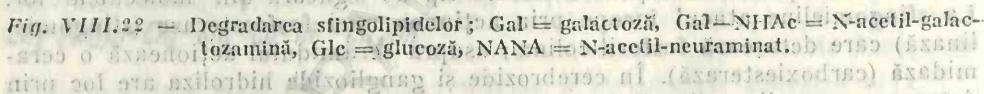


În fig. VIII.21 se arată succesiunea de reacții pentru sinteza ganglioizidului  $GM_1$ .

Degradarea singolipidelor are loc sub acțiunea secvențială a numeroase hidrolaze cu specificitate pentru fiecare tip de legătură din moleculele lor. La sfingomieline atacul începe prin acțiunea unei fosfoesteraze (sfingomielinază) care detasează fosforil-colina; asupra ceramidului acționează o ceramidază (carboxiesterază). În cerebrozide și ganglioizide hidroliza are loc prin detașarea resturilor glicozil începînd de la capătul nereducător. Fiecare tip de legătură glicozidică este scindată de o glicozidază specifică. Ample cunoștințe despre aceste enzime hidrolitice, multe dintre ele localizate în lizozomi, au fost obținute prin studiul unor boli ereditare caracterizate prin acumulare de sfingolipide în viscere, în creier (lipidoze sau sfingolipidoze). Deficiența sau absența unei hidrolaze blochează secvența de degradare și produsul situat în amonte față de enzima deficitară se acumulează. În fig. VIII.22 sînt arătate căile de degradare a sfingolipidelor și principalele deficiențe enzimatice care provoacă lipidoze.

Boala Niemann-Pick este una dintre lipidozele cu cea mai mare frecvență (1 caz la 330 000 născuți vii). Boala este datorată deficitului de sfingomielinază lizozomală din ficat, splină, creier etc. Se acumulează cantități excesive de sfingomieline în țesuturi. Boala se manifestă clinic cu hepatomegalie, splenomegalie, tulburări digestive, întârziere psihomotorie, convulsii.

Ganglioizidoză  $GM_1$  este datorată deficitului enzimatic al unei galactozidaze care detasează restul galactozil terminal din  $GM_1$ . Aceeași enzimă acționează și asupra glicoproteinelor și mucopolizaharidelor.



*Boala Gaucher.* În această lipidoză deficitul enzimatic interesează hidrolaza lizozomală care detașează glucoza din glucocerebrozide. Enzima se află în splină, ficat, rinichi, intestin, creier. Glucocerebrozidele sînt intermediari

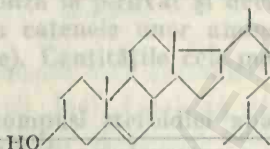


în cursul degradării ganglioizidelor. Se acumulează în țesuturi (splina este afectată în principal) glucocerebrozide, alături de  $GM_1$ ,  $GM_2$ . Alături de splenomegalie, tabloul clinic este dominat de tulburări hematologice, întrucât membrana eritocitară cuprinde cantități importante de gangliozide.

**Leucodistrofia metacromalică.** Deficitul enzimatic în această boală este situat la nivelul hidrolazei (sulfatidază) care detașează resturile sulfat din sulfatide. Se acumulează în sistemul nervos (substanța albă), în rinichi, ficat etc., cantități excesive de sulfatide. Boala se manifestă prin tulburări neurologice și psihice.

## VIII.8. METABOLISMUL COLESTEROLULUI

Colesterolul este principalul steroid din organismele animale:



El îndeplinește următoarele funcții:

a) Liber sau ca acil-cholesterol este element structural al membranelor celulare și al lipoproteinelor plasmatice. Catena alifatică și nucleul rigid al steranului inserați între moleculele fosfolipidice din straturile dublu lipidice reglează fluiditatea membranelor (fig. VIII.23).

Creierul, îndeosebi substanța albă, cuprinde cantități relativ mari de colesterol liber. Conținutul în colesterol al creierului și al nervilor crește în perioada de mielinizare după care rămâne constant tot restul vieții. Acest

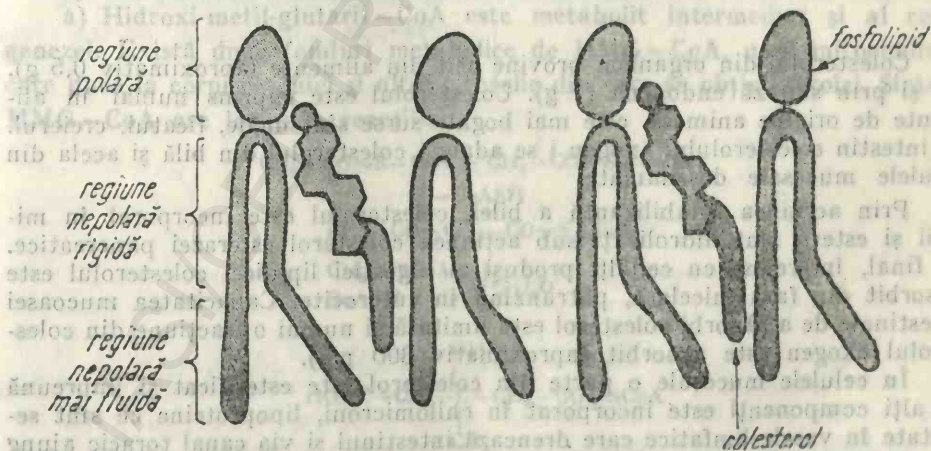


Fig. VIII.23 — Intercalarea colesterolului printre moleculele fosfolipidelor reglează fluiditatea membranelor.

colesterol este stabil metabolic. Ficatul este al doilea țesut în ceea ce privește conținutul total în colesterol, în mare parte ca acil-colesterol și cu un turnover foarte rapid. Cortexul adrenalilor, gonadele cuprind mult colesterol raportat la gram de țesut, aceste glande sintetizează hormoni steroidici. Lipoproteinele plasmatice cuprind colesterol în proporții variabile (Tabelul VIII.4). Aceste particule reprezintă forme de transport al colesterolului între diverse compartimente ale organismului, intestin—ficat—țesuturi extrahepatice.

Tabelul VIII.4

#### Concentrația lipidelor serice (adult normal)

(după: Ministerul Sănătății și Academia de Științe Medicale, Metode curente pentru analize de laborator clinic, Editura Medicală, 1982)

Lipide	mg/dl
Lipide totale	550—750
Trigliceride	30—140
Colesterol total	120—260
Fosfolipide totale	180—260
Acizi grași liberi	12— 16

b) Colesterolul este precursorul hormonilor steroidici-corticosuprarenali, sexuali și a acizilor biliari.

c) Colesterolul (sau un precursor al său) este materia primă pentru sinteza calciferolului (vitamina D<sub>3</sub>).

### VIII.8.1. DIGESTIA ȘI ABSORBȚIA COLESTEROLULUI

Colesterolul din organism provine atât din alimente (aproximativ 0,5 g), cât și prin sinteză endogenă (1 g). Colesterolul este cuprins numai în alimente de origine animală, cele mai bogate surse sînt ouăle, ficatul, creierul. În intestin colesterolului exogen i se adaugă colesterolul din bilă și acela din celulele mucoasale descuamate.

Prin acțiunea solubilizantă a bilei, colesterolul este incorporat în miceli și esterii sînt hidrolizați sub acțiunea colesterol esterazei pancreatice. În final, împreună cu ceilalți produși ai digestiei lipidice, colesterolul este absorbit din faza micelară, pătrunzînd în enterocite. Capacitatea mucoasei intestinale de a absorbi colesterol este limitată și numai o fracțiune din colesterolul exogen este absorbit (aproximativ 300 mg).

În celulele mucoasale o parte din colesterol este esterificat și împreună cu alți componenți este incorporat în chilomicroni, lipoproteine ce sînt secrete în vasele limfatice care drenează intestinul și via canal toracic ajung în circulația sanguină.

(A se vedea mai departe metabolismul colesterolului.)



## VIII.8.2. BIOSINTEZA COLESTEROLULUI

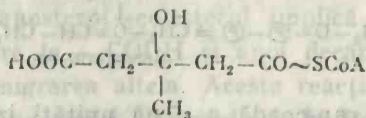
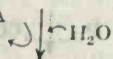
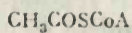
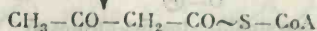
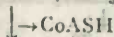
Colesterolul este sintetizat în organism din precursori simpli. Toate țesuturile sint dotate cu echipamentul enzimatic necesar sintezei de colesterol, ficatul și intestinul deținând însă primele locuri. Substanța nervoasă este sediul unei sinteze active de colesterol numai în timpul mielinizării nervilor și fondul de colesterol din creier și nervi este metabolic inert. Adrenalele și glandele sexuale sintetizează colesterol ce este utilizat mai departe pentru sinteza de hormoni, acest fond nu participă la circuitul metabolic al colesterolului. Ficatul este furnizorul principal de colesterol pentru țesuturile extrahepatice și totodată, este locul de tranzit al colesterolului în vederea excreției. În mucoasa intestinală are loc o biosinteză activă de colesterol, și acela pierdut prin descuamarea epitelului intestinal este în parte reabsorbit.

Materia primă pentru sinteza colesterolului este acetil~CoA care poate fi obținută din glucoză (glicoliză la piruvat și decarboxilare oxidativă), acizi grași (prin  $\beta$ -oxidare) și din catenele unor aminoacizi (după transaminare și degradarea catenei ternare). Cantitățile cele mai mari de acetil~CoA sint furnizate de acizii grași.

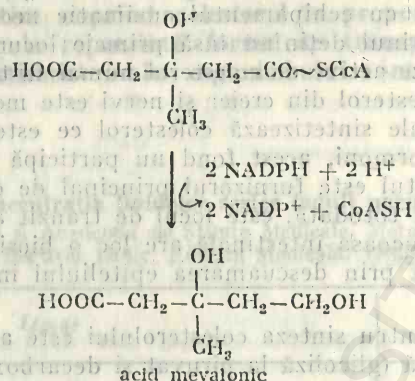
Colesterolul și ceilalți compuși steroidici aparțin grupului de compuși poliizoprenici. El se formează prin condensarea a șase unități de izopren activ. Biosinteza colesterolului poate fi împărțită în mai multe etape:

- a) formarea hidroxi-metil-glutaril~CoA (HMG~CoA) din acetil~CoA;
- b) transformarea HMG~CoA în „izopren biologic activ“;
- c) condensarea a șase unități izoprenice cu formarea unei hidrocarburi avînd 30 atomi de carboni, denumită scualen;
- d) ciclizarea scualenului și formarea lanosterolului, primul compus steroidic;
- e) transformarea lanosterolului în colesterol.

a) Hidroxi-metil-glutaril~CoA este metabolit intermediar și al ceto-genezei. Există două fonduri metabolice de HMG~CoA, unul mitocondrial care duce la corpi cetoni și altul citosolic din care se obțin steroizi. Sinteza HMG~CoA are loc prin reacțiile:

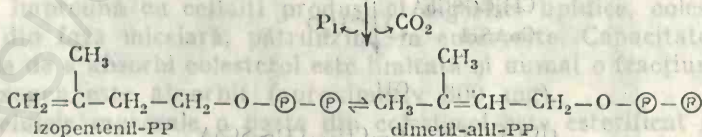
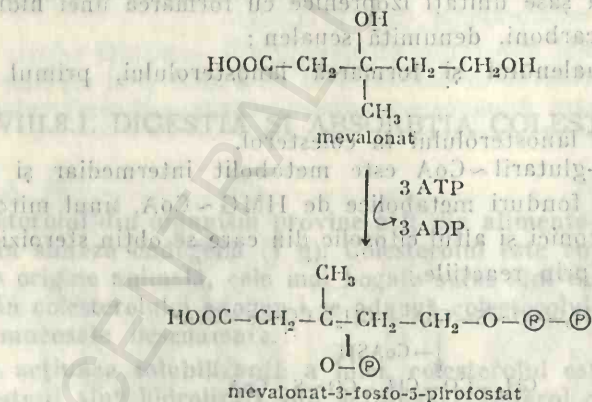


b) Transformarea HMG~CoA în mevalonat este un proces reductiv, dependent de NADPH și este prima etapă specifică colesterogenezei, este etapa reglatorie a procesului :



Enzima, HMG~CoA reductază este sensibilă la acțiunea unor efectori alosterici ; este inhibată de produsul final, de colesterol.

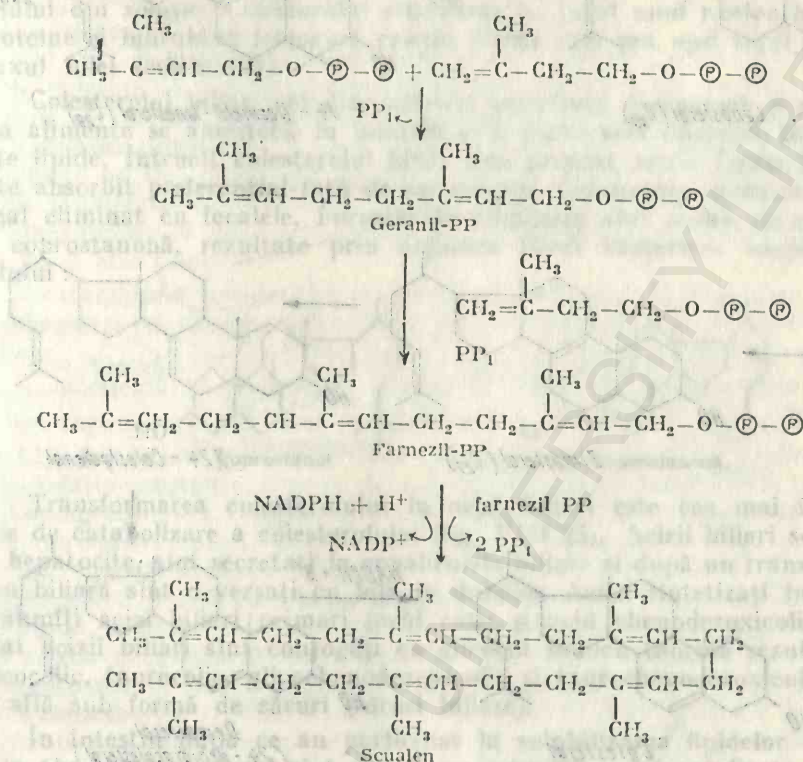
Din mevalonat prin trei reacții de fosforilare se obține mevalonat-3-fosfo-5-pirofosfat ; acesta din urmă prin decarboxilare și pierderea unui rest fosfat dă naștere la „izoprenul activ“ care există în două forme izomere, de dimetil-alil-pirofosfat și de izopentenil-pirofosfat :



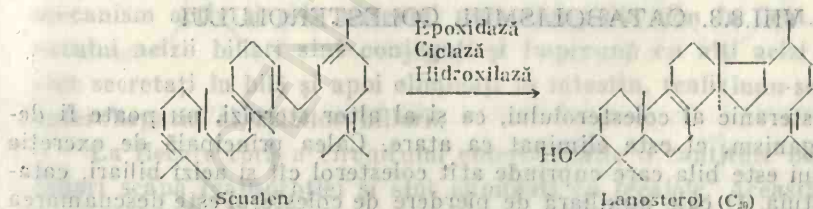
c) Prin condensare cap-coadă a două unități izoprenice se obține un compus C<sub>10</sub> (geranil-pirofosfat) ; acesta mai departe cu o nouă moleculă de



izopren activ formează un derivat  $C_{15}$  (farnesil-pirofosfat). Două molecule  $C_{15}$  prin condensare cap-cap formează o hidrocarbură  $C_{30}$ -scualen:



d) Sub acțiunea unui sistem enzimatic complex scualenul este transformat într-un steroid  $C_{30}$ , lanosterol:



e) Transformarea lanosterol→colesterol implică pierderea a trei grupări  $-\text{CH}_3$  (prin oxidare la  $-\text{COOH}$  și apoi decarboxilare), hidrogenarea unei duble legături și migrarea alteia. Aceste reacții pot avea loc în secvențe variate, rezultând numeroși intermediari. În fig. VIII.24 se arată una din aceste secvențe.

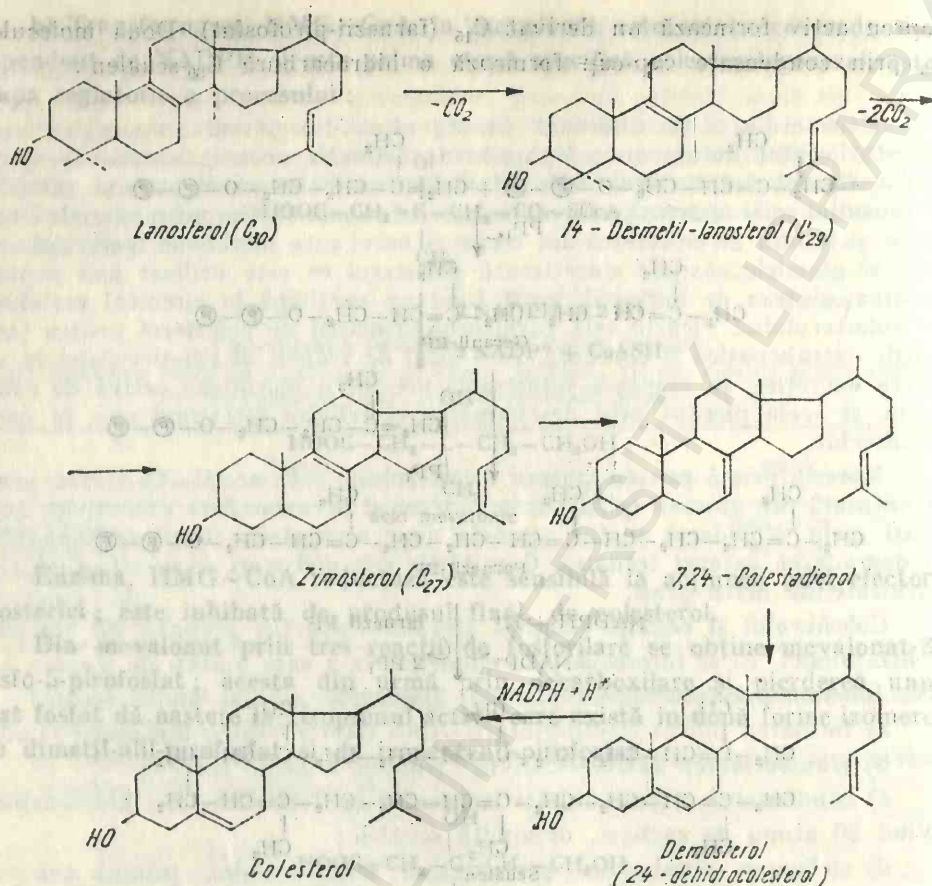


Fig. VIII.24 — Transformarea lanosterol→colesterol.

### VIII.8.3. CATABOLISMUL COLESTEROLULUI

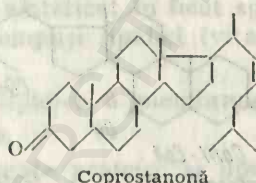
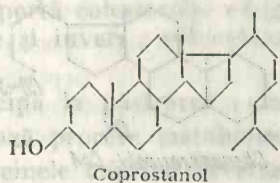
Nucleul steranic al colesterolului, ca și al altor steroizi, nu poate fi degradat în organism, el este eliminat ca atare. Calea principală de excreție a colesterolului este bila care cuprinde atât colesterol cît și acizi biliari, cataboliți ai acestuia. O cale auxiliară de pierdere de colesterol este descuamarea pielii și a epitelului intestinal. Ținîndu-se seama de importanța excreției biliare rezultă că tranzitul colesterolului prin ficat este obligatoriu în vederea eliminării sale. Mai trebuie subliniat că acizii biliari în afară de faptul că sînt cataboliți ai colesterolului, ei au roluri esențiale la digestia și absorbția lipidelor din intestin.

Bila cuprinde relativ mult colesterol, în cea mai mare parte neesterificat (aproximativ 1,5 g/l în bila hepatică și 6,5 g/l în bila veziculară). Coleste-



rolul, hidrofob, este menținut în soluție prin asociere cu substanțe amfipatice, lecitine și săruri biliare. Solubilizarea colesterolului necesită un raport bine determinat între fosfolipide—colesterol—săruri biliare, modificări minore ale unuia dintre componenții sistemului determină scoaterea colesterolului din soluție. Colesterolul cristalizat în jurul unui nucleu alcătuit din proteine și bilirubină formează calculi biliari care pot opri total sau parțial fluxul bilei (colecistiază).

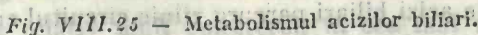
Colesterolul biliar, cel din epiteliul intestinal descuamat și colesterolul din alimente se amestecă în intestin și o parte este absorbit împreună cu alte lipide. Întrucât colesterolul biliar este prezent într-o formă micelară el este absorbit preferențial față de cel exogen. Colesterolul neabsorbit este în final eliminat cu fecalele. Formele de eliminare sînt acelea de coprostanol și coprostanonă, rezultate prin acțiunea florei bacteriene asupra colesterolului :



Transformarea colesterolului în acizi biliari este cea mai importantă cale de catabolizare a colesterolului (fig. VIII.25). Acizii biliari se formează în hepatocite, sînt secretați în canaliculele biliare și după un tranzit prin vezica biliară sînt defecați cu bila în duoden. Acizii sintetizați în ficat sînt denumiți acizi biliari primari (acid colic și acid chenodezoxicolic). Tot în ficat acizii biliari sînt conjugați cu glicocol sau cu taurină rezultînd acizii glicocolic, taurocolic, glicochenodezoxicolic și taurochenodezoxicolic. În bilă se află sub formă de săruri (săruri biliare).

În intestin după ce au participat la solubilizarea lipidelor alimentare și la absorbția acestora, sînt supuși unor transformări catalizate de enzime ale florei bacteriene intestinale : îndepărtarea grupei hidroxil din poziția 7 și hidroliza legăturii amidice. Se formează în acest fel acizi biliari secundari : acidul dezoxicolic (din acid colic) și acidul litocolic (din acid chenodezoxicolic). În segmentul distal al ileonului acizii biliari sînt reabsorbiți printr-un mecanism activ și prin sistemul port ajung din nou în ficat. La nivelul ficatului acizii biliari sînt conjugați și împreună cu alți acizi biliari primari sînt secretați în bilă și apoi eliminați în intestin, realizîndu-se astfel circuitul enterohepatic al acizilor biliari.

La fiecare tură a circuitului enterohepatic o cantitate oarecare de acizi biliari scapă reabsorbției și sînt eliminați cu fecalele. Această pierdere netă de acizi biliari constituie o cale de excreție a colesterolului. Se estimează că o moleculă individuală de acid biliar parcurge de cîteva ori circuitul ficat-intestin-ficat-intestin înainte de a fi eliminată. Ținîndu-se seama că fondul de acizi biliari al unui adult este de 5—6 g și că aceștia circulă de 5—6 ori, rezultă că 20—30 g de acizi biliari parcurg zilnic circuitul enterohepatic. Pierderile de acizi biliari prin fecale sînt apreciate la aproximativ 0,5 g/zi.





## VIII.9. LIPIDELE PLASMATICE

Trigliceridele din țesutul adipos și din celelalte țesuturi reprezintă cel mai important depozit de rezerve energetice ale organismului (aproximativ 135 000 kcal pentru un adult normal). Aceste depozite se formează din grăsimile ingerate în exces sau sînt forma de stocare a surplusului de glucide exogene. Transportul trigliceridelor alimentare și a celor sintetizate endogen la locurile de depozitare și apoi distribuția lor către organele consumatoare presupune un flux plasmatic continuu de trigliceride și de alte categorii de lipide. Trigliceridele hidrofoabe se asociază cu alte lipide și cu proteine sub formă de lipoproteine. Pe lângă transportul de trigliceride, lipoproteinele plasmatice mai au și alte roluri :

— transportă colesterolul exogen și cel sintetizat în ficat spre țesuturile extrahepatice și invers ; vehiculează alți compuși lipidici (vitamine liposolubile) ;

— participă la păstrarea compoziției lipidice a membranelor ;

— reglează procese metabolice celulare.

Lipoproteinele cuprind diverse componente proteice și lipidice în proporții relativ constante, ceea ce denotă existența unor interacțiuni cu un înalt grad de specificitate. Componentele proteice ale lipoproteinelor sînt denumite apolipoproteine (apo-A, apo-B, apo-C etc.). Lipoproteinele au o structură comună, lipidele nepolare, trigliceridele și esterii colesterolului, formează un miez hidrofob îmbrăcat într-un strat de componenți polari, apolipoproteine, fosfolipide, colesterol. Lipoproteinele cuprind și cantități mici de glucide (sub formă de glicoproteine). Asocierea diverselor componente se face prin forțe necovalente și în timpul metabolismului intravascular al lipoproteinelor au loc schimburi și transferuri de lipide și proteine între diversele lipoproteine circulante sau între acestea și țesuturi, sub acțiunea unor proteine specifice sau ca procese de echilibru.

Apolipoproteinele pe lângă funcția de componente amfipatice a lipoproteinelor mai îndeplinesc și funcții specifice, oferă situsuri de recunoaștere pentru receptorii de pe suprafața celulelor sau funcționează ca activatori (sau inhibitori) ai enzimelor care participă la metabolismul lor.

### VIII.9.1. ANALIZA LIPIDELOR PLASMATICE

Lipidele plasmatice pot fi analizate prin două procedee :

a) dozarea lipidelor ca specii moleculare, prin reacții specifice, sau prin extracție cu solvenți selectivi și dozarea fiecărei fracțiuni ; lipemia totală și concentrațiile diverselor categorii sînt prezentate în tabelul VIII.4 ;

b) separarea lipoproteinelor ca entități morfofuncționale și cercetarea compoziției lor proteice și lipidice. Prin acest gen de analize s-a putut înțelege dinamica lipidelor plasmatice, geneza și modul lor de utilizare.

Lipoproteinele plasmatice pot fi separate prin ultracentrifugare și prin electroforeză. Ultracentrifugarea are la bază diferențele de densitate în raport cu conținutul lipoproteinelor în lipide și proteine. Trigliceridele pure au densități de 0,95 g/ml, o lipoproteină cu un conținut egal de lipide și proteine are o densitate de 1,063 g/ml, proteinele pure au densități mai mari de 1,28 g/ml. În cimpuri gravitaționale puternice (de aproximativ  $100\,000 \times g$ ) lipoproteinele, după densitatea mediului de suspensie se vor sedimenta (dacă au densități mai mari decât ale mediului) sau vor flota, dacă au densități mai mici. Prin ultracentrifugări în medii cu densități potrivite au fost obținute din ser patru fracțiuni lipoproteice majore :

- chilomicronii ;
- lipoproteinele cu densitate foarte mică (VLDL, de la very low density lipoproteins) ;
- lipoproteinele cu densitate mică (LDL, de la low density lipoproteins) ;
- lipoproteinele cu densitate mare (HDL, de la high density lipoproteins).

Lipoproteinele, în principal prin componentele lor proteice superficiale, poartă sarcini electrice și pot fi separate prin electroforeză. Separarea se efectuează la pH alcalin (8,6) și componentele sînt vizualizate cu ajutorul unor coloranți cu afinitate pentru lipide. Electroforeza lipoproteinelor se efectuează pe hîrtie sau pe geluri de agaroză, de poliacrilamidă. Prin această tehnică sînt separate patru fracțiuni (fig. VIII.26) :

- chilomicronii care nu migrează
- pre- $\beta$ -lipoproteinele
- $\beta$ -lipoproteinele
- $\alpha$ -lipoproteinele

Aceste fracțiuni corespund :

- pre- $\beta$ -lipoproteine = VLDL
- $\beta$ -lipoproteine = LDL
- $\alpha$ -lipoproteine = HDL

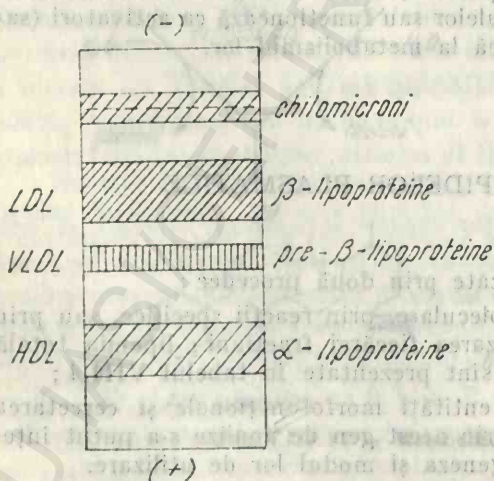


Fig. VIII.26 — Fracțiunile lipoproteice ce pot fi separate prin electroforeza serului.



Lipoproteinele plasmatice

Frațiune lipoproteică	Sf	Densitate (g/ml)	Diametru (nm)	Greutatea moleculară (daltoni)	Proteine %	Lipide %					Acizi grasi liberi
						Total	Triglic- eride	Fosfo- lipide	Coles- terol	Acil- col.	
Chilomicroni	400	0,96	75—600	$0,4-30 \times 10^6$	1—2	98—99	86—94	3—8	0,5—1	1—3	—
Lipoproteine cu densitate foarte mică, VLDL, pre- $\beta$ -lipoproteine	20—400	0,96— 1,009	25—75	$5-10 \times 10^6$	5—10	89—94	55—65	12—18	6—8	12—4	—
Lipoproteinele cu densitate mică, LDL, $\beta$ -lipoproteine	0—20	1,006— 1,063	20—25	$2,2-3,5 \times 10^6$	20—24	75—80	8—12	20—25	5—10	35—40	—
Lipoproteine cu densitate mare, HDL, $\alpha$ -lipoproteine	—	1,065— 1,125	10—20	$0,25 \times 10^6$	45—50	50—55	3—6	20—30	3—5	14—18	—
Acizi grași liberi AGL		1,28	—	—	99	1	—	—	—	—	1

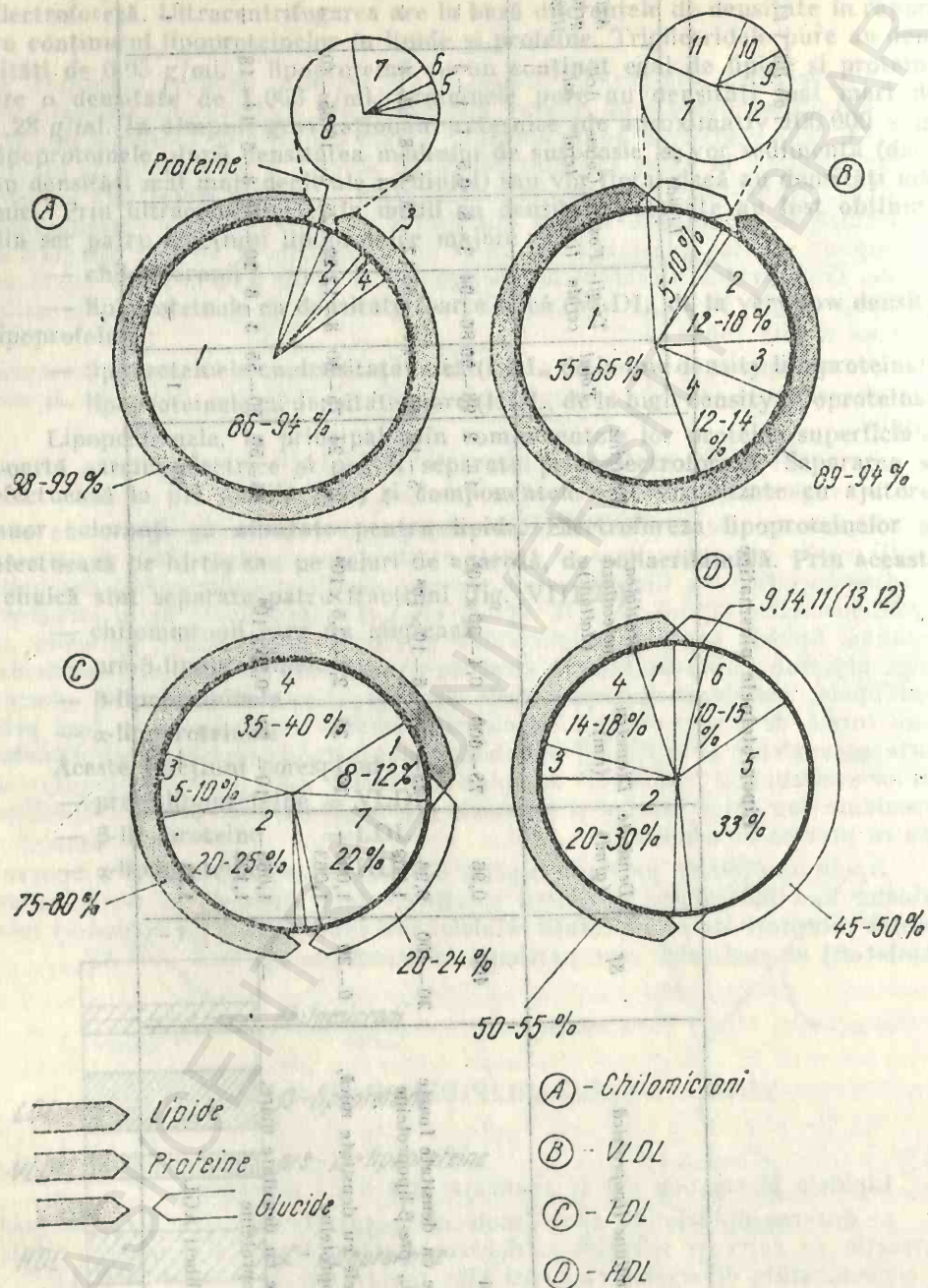


Fig. VIII.27 — Compoziția hipoproteinelor plasmatice: Trigliceride-1; Fosfolipide-2; Colesterol-3; Colesterol esterificat-4; Apo AI-5; Apo AII-6; Apo B-7; Apo C-8; Apo CI-9; Apo CII-10; Apo CIII-11; Apo E-12; Apo D-13; Apo DII-14.



În tabelul VIII.5 și fig. VIII.27 sînt prezentate unele date privind lipoproteinele plasmatice. De notat că serul ob  tinut din s  nge normal recoltat diminea  a după 8—10 ore de nem  ncare (   jeun) nu cuprinde chilomicroni și VLDL sînt prezenți în urme. Acizii gra  i liberi, asocia  i cu serum albumina, nu constituie o fracțiune lipoproteică propriu-zisă. O importanța deosebită pentru înțelegerea rolurilor și a dinamicii concentrațiilor lipoproteinelor serice prezintă apolipoproteinele.   n tabelul VIII.6 sînt descrise principalele apolipoproteine, rolurile pe care le au, concentrațiile lor (atunci c  nd sînt cunoscute).

Tabelul VIII.6

**Apolipoproteinele plasmatice**

<i>Apolipoproteina</i>		<i>Greutate moleculară (daltoni)</i>	<i>Conc. ��n plas��m�� mg/dl medii/limite</i>	<i>Funcție</i>
Apolipoproteina A	Apo A		235(170—325)	Constituent major al HDL
	Apo A I	28 000	150(90—210)	Activator al LCAT
	Apo A II	17 000	46(26—66)	
	Apo A III	46 000	14	
Apolipoproteina B	Apo B		97(60—155)	Constituent major al:
	Apo B 48			CM
	Apo B 100			LDL, VLDL Biosinteza și secreția lipoproteinelor Interac��ie cu receptori celulari
Apolipoproteina C	Apo C			Constituent al CM, VLDL, HDL, LDL
	Apo C I	6 000		Activator al lipoprotein-lipazei Inhibitor al lipoprotein-lipazei
	Apo C II	10 000		
	Apo C III	9 000		
Apolipoproteina D	Apo D	22 000	8—10	Transportor de colesterol esterificat între diverse lipoproteine
Apolipoproteina E	Apo E	36 000	3—5	Interac��ioneaz�� cu receptori din hepatocit
Apolipoproteina F	Apo F	30 000		
Apolipoproteina G	Apo G	72 000		

### VIII.9.2. CHILOMICRONII

Sînt lipoproteine cu un conținut foarte mare de lipide (98—99%) și puține proteine (1—2%). Au dimensiuni mari, refractă lumina și conferă plasmei un aspect lactescent. Au densități mai mici decît ale serului (1,006) și prin păstrarea serului la rece chilomicronii se ridică la suprafață sub forma unui strat cremos. Chilomicronii sînt sintetizați în celulele mucoasei intestinale și încorporează lipidele alimentare absorbite. Sînt secretați în vasele limfatice care drenează intestinul și, la nivelul canalului toracic, trec în plasmă. Imediat după secreție particulele au o compoziție diferită de acelea circulante, de aceea se face distincție între particulele primare, chilomicronii născinzi și cele secundare, chilomicronii propriu-ziși. Particulele născinze cuprind apo-B și apo-A. Complementul de apolipoproteine C și E îl dobîndesc în plasmă prin transferul acestor proteine de la HDL.

Chilomicronii sînt prezenți în plasmă după ingerare de alimente bogate în grăsimi. În fig. VIII.28 se arată intensitatea răspunsului lipemic (creșterea trigliceridemiei după ingestia de grăsimi) și durata acestui răspuns la subiecții normali. După 6—7 ore de la ingestia de grăsimi chilomicronii dispar din sînge, plasma se clarifică.

Catabolismul chilomicronilor are loc în două etape. În prima etapă trigliceridele componente sînt hidrolizate sub acțiunea lipoproteinlipazei.

Această enzimă (sau grup de enzime) acționează specific asupra legăturilor 1 și 3 din acilgliceroli formîndu-se 2-monoglicerid, compus hidrolizat mai departe la glicerol și acizi grași. Țesuturile cele mai bogate în lipoproteinlipază sînt țesutul adipos, mușchii scheletici, miocardul, glanda mamară, pulmon. Aceste țesuturi utilizează acizi grași pentru oxidare (mușchi), depozitare (țesut adipos) sau secreție de grăsimi (glanda mamară). Enzima se află pe suprafața luminală a endoteliului vascular fiind ancorată prin glicozaminoglicani. Heparina eliberează enzima în plasmă.

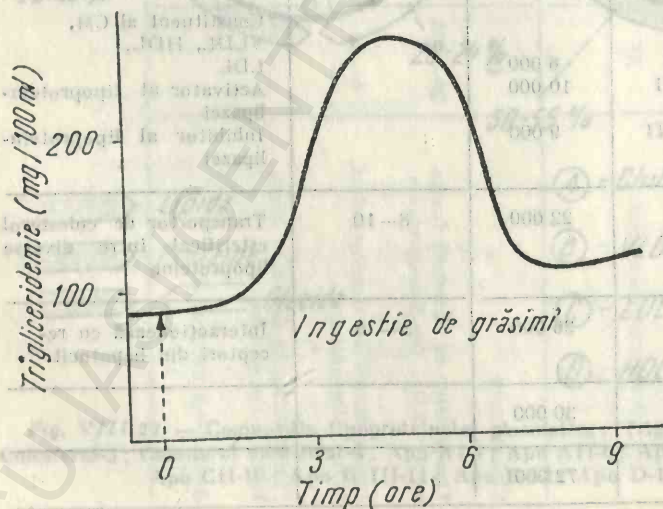


Fig. VIII.28 — Variația lipemiei după ingestia de grăsimi.



Lipoproteinlipaza este activată de apolipoproteina C-II, component al chilomicronilor.

Lipoproteinlipazele din diverse țesuturi au proprietăți cinetice diferite. Enzima din inimă are afinitate mai mare pentru substrat ( $K_m$  mic) decât enzima din țesutul adipos. Când nivelul chilomicronilor este scăzut, miocardul extrage cu viteză mai mare trigliceride plasmatice decât țesutul adipos. Lipoproteinlipaza din țesutul adipos atinge viteză maximă după ce enzima miocardică este deja saturată. În plus, activitatea lipoproteinlipazei în țesutul adipos este reglată de factori nutriționali și hormonal. Activitatea enzimei crește după ingestia de grăsimi (și/sau glucide). Aceste efecte sînt probabil mediate de insulină. Activitatea lipoproteinlipazei din glanda mamară este dependentă de stimularea prin prolactină, are activitate ridicată numai în perioadele de lactație.

Pe măsură ce hidroliza trigliceridelor avansează, componenții superficiali devin supranumerari. Colesterolul liber, fosfolipidele, apolipoproteinele C sînt transferate pe HDL. Treptat chilomicronii devin „resturi chilomicronice”.

A doua etapă a catabolismului chilomicronilor constă în captarea resturilor de către ficat, captare facilitată de apolipoproteina E. Componenții resturilor chilomicronice sînt hidrolizate și utilizate în mod specific. Pe această cale ajunge la ficat o parte din colesterolul exogen și cel intestinal. Colesterolul eliberat din resturile chilomicronice inhibă HMG-CoA reductaza, reglînd sinteza colesterolului în hepatocit.

Metabolismul chilomicronilor este perturbat la subiecții cu deficite înăscute de lipoproteinlipază, de apo-B. Boala familială, hiperchilomicronemie (hiperlipoproteinemie de tip I) este determinată de deficiența în lipoproteinlipază. Concentrația chilomicronilor, a trigliceridelor prezintă creșteri marcate și persistente. Au loc depuneri de trigliceride în țesuturi (xantoame). Incidența aterosclerozei la acești bolnavi este joasă.

Anomalia sintezei apolipoproteinei B la nivel intestinal are drept urmare imposibilitatea formării chilomicronilor și transportului lipidelor exogene. Se acumulează trigliceride în celulele intestinale și consecutiv este perturbată absorbția altor lipide din intestin (lipidele sînt eliminate prin fecale, steatoree), organismul este carentat în vitamine liposolubile. Tabloul lipidic sanguin este modificat în sensul scăderii lipidelor totale, a trigliceridelor, a colesterolului.

### VIII.9.3. LIPOPROTEINELE CU DENSITATE FOARTE MICĂ

(VLDL, pre- $\beta$ -lipoproteine)

Aceste lipoproteine sînt sintetizate în ficat, au un conținut ridicat de lipide (89—94%) între care predomină trigliceridele (55—65%), după care urmează fosfolipidele (12—18%), esterii ai colesterolului (12—14%) și colesterolul liber (6—8%). Au densități cuprinse între 0,96 și 1,006 g/ml. Particulele născînde cuprind apo-B (B-100) drept componentă proteică majoritară. În plasmă VLDL născînde primesc apo-C și apo-E de la HDL.

Funcția principală a VLDL este transportul trigliceridelor sintetizate în ficat spre țesuturile extrahepatice. Apolipoproteinele și celelalte componente lipidice au roluri auxiliare în transportul trigliceridelor. VLDL sînt prezente în plasmă după ingerare de rații bogate în glucide. Excesul caloric de glucoză este convertit în ficat în trigliceride și exportat sub formă de VLDL. Singele recoltat dimineața de la un subiect normal după un post de 8—16 ore, este practic lipsit de VLDL, acestea sînt catabolizate rapid sub acțiunea lipoproteinlipazei. În foame prelungită, în inanție, în diabet, plasma cuprinde VLDL ca urmare a unei sinteze crescute de trigliceride hepatice pe seama acizilor grași liberi circulanți.

Amplificarea sintezei de trigliceride hepatice și/sau perturbarea căilor de sinteză și de export a VLDL are drept consecință acumularea grăsimilor în ficat (ficat gras, steatoză, infiltrație grăsoasă a ficatului). Această situație survine fie din cauza unei producții crescute de trigliceride, care depășește capacitatea ficatului de sinteză și secreție de VLDL, fie la un nivel normal de sinteză a trigliceridelor cînd formarea VLDL este perturbată prin deficit de proteine, de fosfolipide (fosfatidil-coline) sau ritmul de secreție a VLDL este încetinit. Inhibitorii sintezei de proteine (antibioticul puromicină), deficiența de colină sau a unei surse de grupări metil, deficiența de acizi grași esențiali (acid linoleic), diverse toxice ( $\text{CCl}_4$ , fosfor, etanol) determină ficat gras. Agenții care au acțiune protectoare sau favorizează exportul trigliceridelor hepatice sînt denumiți factori lipotropi (metionina și proteinele bogate în metionină, grăsimile nesaturate, vitamina E etc.).

VLDL circulante, îmbogățite în apo-C II activator al lipoproteinlipazei, sînt supuse acțiunii acestei enzime care hidrolizează trigliceridele. Glicerolul este eliberat în plasmă, iar acizii grași sînt captați în țesuturi. Progresiv cu scăderea trigliceridelor are loc și pierderea de apo-C II care trece pe HDL. În același timp particulele se îmbogățesc în colesterol, furnizat de către HDL. Apolipoproteina D componentă a HDL funcționează ca o colesterolestertransferază și colesterolul esterificat este transferat din HDL pe VLDL.

Îmbogățirea VLDL în colesterol mai poate avea loc cu participarea lecitin → colesterolaciltransferazei (LCAT) enzimă plasmatică. Apolipoproteina C I component al VLDL activează această enzimă.

LCAT catalizează reacția :

Licitină + colesterol → 2-lizolecitină + acilcolesterol

Lizolecitina mai hidrofilă este eliberată în plasmă, iar acilcolesterolul apolar migrează în miezul particulei. Locurile superficiale eliberate vor fi ocupate cu colesterol furnizat de HDL. Nu se cunoaște încă ponderea relativă a celor două căi de îmbogățire a VLDL în colesterol.

Paralel cu hidroliza trigliceridelor, îmbogățirea în colesterol, apolipoproteinele C trec la HDL. Apolipoproteina B este însă păstrată, fiind regăsită integral în particulele IDL (intermediate density lipoproteins) și apoi în LDL care rezultă din VLDL. În cursul acestor transformări diametrul particulelor scade de la 25—75 nm la 20—25 nm, greutatea moleculară reducîndu-se aproximativ la jumătate.



#### VIII.9.4. LIPOPROTEINELE CU DENSITATE MICA (LDL, $\beta$ -lipoproteine)

Sînt particule lipoproteice cu densităţi cuprinse între 1,006 şi 1,063 şi diametre de 20—25 nm. Au un conţinut lipidic de 75—80%, componenta majoritară fiind colesterolul, 35—40% colesterol esterificat, 5—10% colesterol liber, 20—25% fosfolipide şi numai 8—12% trigliceride. Apolipoproteina majoritară este apo-B.

LDL se formează în plasmă din VLDL după îndepărtarea trigliceridelor VLDL sub acţiunea lipoproteinlipazei şi imbogăţire în colesterol. LDL sînt prezente în singele recoltat dimineaţa după un post de 8—10 ore şi cuprinde aproximativ 70% din colesterolul total plasmatic (tabelul VIII.7).

Tabelul VIII.7

Concentraţia colesterolului total  
LDL-colesterol şi HDL-colesterol în ser

Colesterol	mg/dl	nmoli/l
Colesterol total	220—260	5,7—6,7
LDL-colesterol	150—190	3,9—4,9
HDL-colesterol (bărbi) (f)	35—55	0,9—1,4
HDL-colesterol (femei)	45—65	1,2—1,7

LDL au rolul de a furniza colesterol diverselor ţesuturi. Mecanismul de transfer al colesterolului din LDL în ţesuturi a fost descris de Goldstein şi Brown (1976). Calea LDL descrisă de Goldstein şi Brown constituie totodată şi un mecanism de reglare a captării, depozitării şi sintezei de colesterol în ţesuturi, de prevenire a acumulărilor sale în celule.

Calea LDL cuprinde mai multe etape (fig. VIII.29).

a) LDL plasmatice prin intermediul apo-B interacţionează cu receptori specifici de pe suprafaţa celulelor. Această interacţiune necesită un cation bivalent ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Numărul de receptori pe un anumit tip de celulă este variabil, este reglat printr-un mecanism feedback de concentraţia LDL în spaţiul extracelular.

b) Lipoproteinele fixate pe receptori sînt translocate în interiorul celulei după care particulele lipoproteice fuzionează cu lisosomii.

c) În lisosomi componentele LDL, proteine, fosfolipide, acilcolesterol, trigliceride sînt hidrolizate de enzimele lisosomale. Colesterolul liber este utilizat în parte pentru nevoile proprii ale celulei (pentru construcţia membranelor, sinteză de hormoni steroidici, de acizi biliari) iar ceea ce prîsoseşte este esterificat şi depozitat în celulă. Această reacţie este catalizată de o acil-CoA → colesterol-acil transferază (ACAT) rezultînd esteri ai colesterolului cu diverşi acizi celulari, în principal acid palmitic, acid palmitoleic, acid oleic. De notat că esterii colesterolului din lipoproteinele plasmatice cuprind în majoritate rest linoleil.

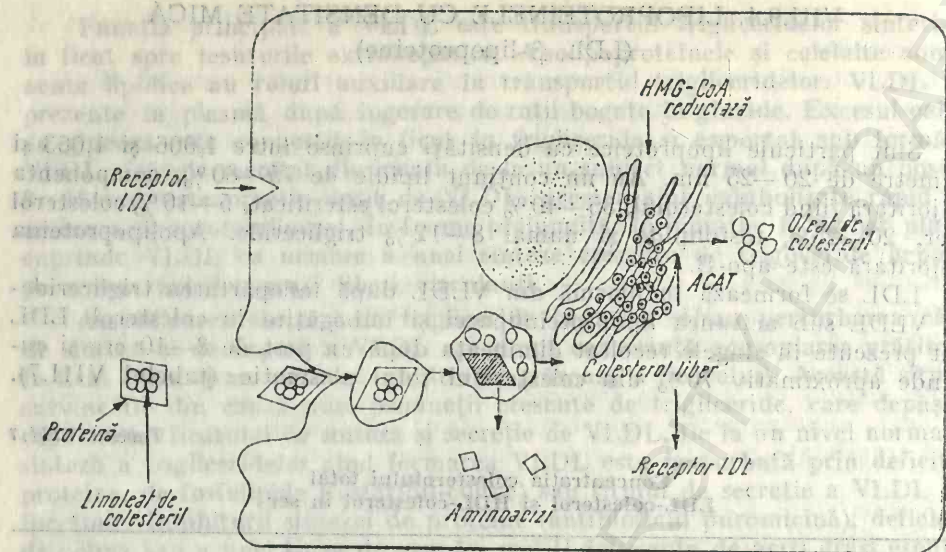


Fig. VIII.29 — Calea LDL (a lui Goldstein și Brown).

Colesterolul liber furnizat celulelor de LDL exercită o acțiune represivă asupra sintezei de novo a colesterolului, prin inhibiția HMG~CoA reductazei și sinteza colesterolului în țesuturile extrahepatice este menținută la un nivel scăzut.

Calea LDL pe lângă reglarea cantității de colesterol intracelular intervine și în reglarea nivelului plasmatic al LDL. Numărul de receptori pentru LDL variază cu cantitatea de particule lipoproteice la care sînt expuse celulele; există o relație inversă între concentrația LDL și numărul de receptori. În acest fel se previne acumularea colesterolului în celule și, pe de altă parte, face posibilă acoperirea nevoilor celulare în colesterol la niveluri scăzute de lipoproteine extracelulare. În mod normal, în stare staționară, numărul de receptori este mijlociu și cantitățile de colesterol obținute din LDL împiedică supraacumularea colesterolului. Scăderea concentrației LDL determină creșterea numărului de receptori membranari și intensificarea captării LDL. Creșterea concentrației LDL determină modificări inverse celor de mai sus. În primul rînd, receptorii celulari existenți se saturează cu LDL furnizînd celulei mult colesterol. Pe lângă inhibiția sintezei de novo a colesterolului are loc și o scădere a numărului de receptori LDL, celula revine la o stare staționară.

Afinitatea receptorilor membranari pentru LDL este foarte mare, se evaluează că ei funcționează maximal la o concentrație a colesterolului LDL de 25 mg/dl. La om valoarea normală a colesterolului LDL este de 120 mg/dl, valoare mult superioară aceleia care ar asigura funcționarea optimă a receptorilor LDL. Acest fapt ar explica incidența crescută a aterosclerozei la om. Într-adevăr, speciile care nu fac în mod normal ateroscleroză au valori LDL și colesterol LDL apropiate de cele ideale.

În afara captării celulare via receptori specifici LDL pot fi preluate prin endocitoză de macrofage, de celule Kupffer din ficat și de alte tipuri de celule. Colesterolul eliberat este depozitat ca esteri hidrofobi. Prin supraîncărcare cu colesterol și alte lipide se formează xantoame și ateroame.



Prin intermediul apolipoproteinei E, particulele LDL interacționează cu o clasă specială de receptori, sint internalizate și depozitate. Nu s-a stabilit cu exactitate ce pondere are ficatul în catabolismul final al LDL.

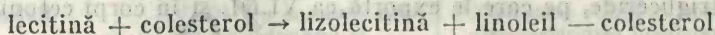
Ținându-se seama de rolul LDL, furnizor de colesterol pentru țesuturile extrahepatice, concentrațiile colesterolului-LDL și apolipoproteinei B au valoare predictivă mult mai bună decât colesterolemia totală ca factori de risc în ateroscleroză. Creșterile concentrațiilor acestor parametri se corelează cu riscul de a face ateroscleroză.

#### VIII.9.5. LIPOPROTEINELE CU DENSITATE MARE

(HDL,  $\alpha$ -lipoproteine)

Această fracțiune lipoproteică este alcătuită dintr-o populație de particule foarte heterogenă, cu densități cuprinse între 1,065 și 1,125. Au un conținut lipidic de 50—55%, predominând fosfolipidele 20—30%, colesterolul 17—23% și puține trigliceride 3—6%. Componenta proteică majoritară este apo-A (apo-A I, apo-A II) dar cuprind cantități mici și din alte apolipoproteine (C, D, E). Nu cuprind însă apo-B.

HDL sint sintetizate și secretate de hepatocite sub forma unor particule născînde cu o compoziție foarte simplă. HDL născînde au o formă discoidală, sint alcătuite dintr-un dublu strat lipidic format din fosfolipide, colesterol liber și apolipoproteine, în principal, apo-A și apo-E. Prin schimburi între celelalte lipoproteine plasmatică și celule particulele născînde se transformă în HDL mature. În aceste transformări un rol deosebit îl are LCAT plasmatică (lecitin-colesterol-acil-transferază) activată de apo-A II component al HDL născînde. Sub acțiunea acestei enzime colesterolul este esterificat la acil-colesterol :



Colesterolul esterificat migrează în interiorul particulei constituind un miez hidrofob. Locurile rămase vacante în stratul superficial al HDL sint ocupate de colesterol, preluat din țesuturi și din alte lipoproteine plasmatică (chilomicroni). Conținutul în colesterol al HDL crește pînă la nivelul particulelor mature.

HDL sint lipoproteine prezente în singele recoltat de la un subiect normal (după 8—10 ore de post) alături de LDL. HDL cuprind aproximativ 30% din colesterolul total din plasmă. Colesterolul-HDL este mai mare la femei (45—65 mg/dl) decît la bărbați (35—55 mg/dl) (tabelul VIII.7).

HDL sint catabolizați în final la nivelul ficatului. Prin intermediul apo-E particulele interacționează cu receptori de pe suprafața hepatocitelor, sint internalizați și componentele degradate.

HDL joacă un rol important în metabolismul colesterolului, participă la transportul acestuia din țesuturile extrahepatice în ficat, sediul catabolismului colesterolului (transformare în acizi biliari și excreție prin bilă).

Concentrațiile colesterolului — HDL și apolipoproteinei-A sînt considerate factori de risc pozitiv în ateroscleroză. Subiecții care prezintă nivele ridicate ale acestor parametri sînt protejați, au un risc scăzut de a face ateroscleroză (tabelul VIII.7).

#### VIII.9.6. ACIZII GRAȘI LIBERI

(AGL, acizi grași neesterificați)

(NEFA = non esterified fatty acids, FFA = free fatty acids)

Această fracțiune lipidică este constituită din acizii grași prezenți în plasmă ca atare și nu drept constituenți ai altor lipide.

Acizii grași sînt greu solubili în apă, în plasmă ei sînt legați de serumalbumină. O moleculă de serumalbumină poate lega 7 molecule de acid gras în situsuri specifice. Capacitatea serumalbuminei de a lega acizi grași în mod normal nu este saturată.

Concentrația acizilor grași în plasmă este mică dar supusă unor fluctuații importante în raport cu factori nutriționali și hormonal. În perioada post-absorbție la concentrații de aproximativ 0,5 nmoli/l, în foame crește moderat (0,7—0,8 nmoli/l). În diabetul netratat, în inaniție ating nivele de pînă la 2 nmoli/l.

Acizii grași liberi din plasmă provin în majoritate din țesutul adipos, cantitatea de acizi grași exportată de țesutul adipos depinzînd de balanța dintre lipoliză și lipogeneză. AGL sînt captați de către diverse țesuturi și utilizați energogen. Cu excepția creierului și hematiilor toate celelalte țesuturi extrag acizi grași din plasmă. Cînd nivelul plasmatic al AGL este ridicat, capacitatea de utilizare de către țesuturile extrahepatice este depășită. În aceste condiții ficatul captează o proporție mare din AGL pe care îi convertește în trigliceride, pe care le exportă ca VLDL și în corpi cetonic.

#### VIII.9.7. DISLIPIDEMIILE

Plasma vehiculează cantități importante de lipide care suferă oscilații ample în raport cu diverși factori nutriționali, metabolici sau hormonal, prin modificarea vitezei influxului sau efluxului lor plasmatic. Studii epidemiologice întreprinse în ultimele decenii au stabilit o relație strînsă între modificările lipidelor sanguine și incidența bolilor cardiovasculare, a aterosclerozei.

Modificarea concentrației lipidelor totale plasmatică, a uneia dintre fracțiuni sau alterarea raportului dintre diversele componente este denumită dislipidemie. Dacă ținem seama că lipidele sînt încorporate în lipoproteine rezultă că orice dislipidemie este o dislipoproteinemie.



Dislipoproteinemii sînt hiper- și hipolipoproteinemii, ultimele fiind mult mai rar întîlnite decît primele. Hiperlipoproteinemii constau în creșterea concentrației fracțiunilor normale LDL ( $\beta$ -lipoproteine) și HDL ( $\alpha$ -lipoproteine) sau apariția și persistența în ser a chilomicronilor și/sau a VLDL (pre- $\beta$ -lipoproteine), lipoproteine care sînt practic absente într-un ser recoltat dimineața după o noapte de post. Dislipidemiile ereditare, familiale, sînt datorate alterării genelor care controlează sinteza, transportul sau utilizarea lipoproteinelor. În alte cazuri alterarea tabloului lipidic sanguin este secundară altor maladii.

Hiperlipoproteinemii primare, familiale, au fost clasificate după Fredrickson în cinci tipuri, I—V, tipul II manifestîndu-se în două variante IIa și IIb. În tabelul VIII.8 și fig. VIII.30 sînt date caracteristicile hiperlipoproteinemii primare în formele lor tipice. În practică tabloul lipidic sanguin, manifestările clinice, pot fi mult mai heterogene, în funcție de exprimarea genei defecte, de momentul evoluției bolii.

Tabelul VIII.8

#### Hiperlipoproteinemiiile familiale

Tipul	Vîrsta la care se manifestă	Aspecte biochimice	Manifestări clinice
I	Copilărie	Hiperechilomicronemie Hipertrigliceridemie Hipercolesterolemie	Xantoame eruptive, lipemia retinalis, hepatosplenomegalie, dureri abdominale
IIa	La orice vîrstă	LDL crescute Hipercolesterolemie	Xantomatoză, boală vasculară aterosclerotică prematură
IIb	La orice vîrstă	LDL și VLDL crescute Hipertrigliceridemie Hipercolesterolemie	Obezitate, lipsesc xantoamele, boală vasculară arterosclerotică prematură
III	Adult	VLDL cu conținut ridicat în colesterol și mobilitate anormală Hipertrigliceridemie Hipercolesterolemie	Xantoame eruptive, boală vasculară arterosclerotică accelerată
IV	Adult	VLDL crescute Hipertrigliceridemie	Obezitate, boală vasculară arterosclerotică prematură, hepatosplenomegalie, hiperuricemie
V	Adolescență	Chilomicronemie VLDL crescute Hipertrigliceridemie Hipercolesterolemie	Xantoame eruptive, lipemia retinalis, boală vasculară arterosclerotică prematură

*Hiperlipoproteinemie de tip I (hiperechilomicronemie, hipertrigliceridemie exogenă majoră).*

Caracteristic pentru această dislipidemie este prezența chilomicronilor în cantitate mare. Răspunsul lipemic (creșterea postprandială a lipidemiei) la acești bolnavi este foarte intens și persistent. Serul are un aspect lăptos

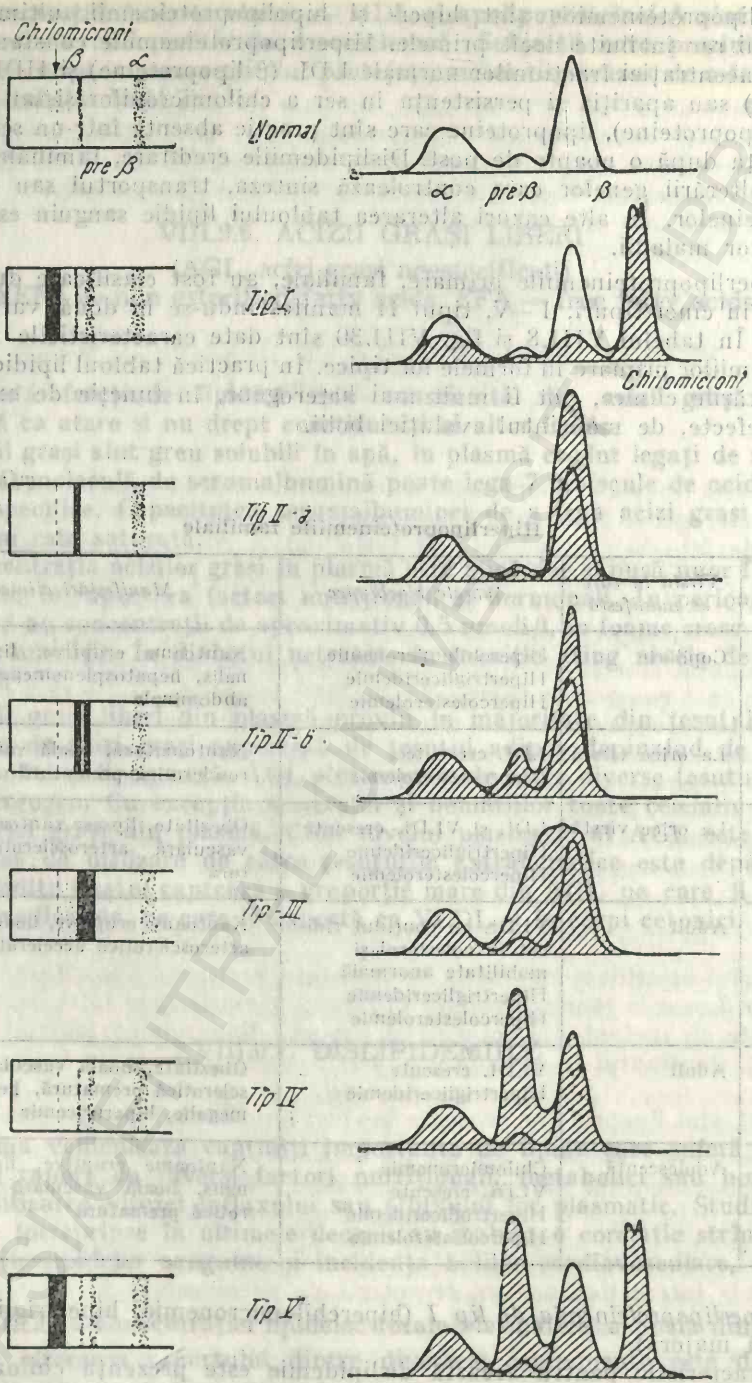


Fig. VIII.30 — Aspectul lipidogramei în hiperlipoprotinemiiile familiale.



și prin păstrare la rece separă un strat cremos de trigliceride. Lipidograma cuprinde o bandă intensă în regiunea chilomicronilor. Trigliceridemia este crescută, colesterolul prezintă creșteri mai moderate. Defectul biochimic al acestei dislipidemii constă într-o deficiență a lipoproteinlipazei, enzimă implicată în delipidarea chilomicronilor și epurarea lor plasmatică.

Boala se manifestă clinic din primele luni de viață prin dureri abdominale, hepatosplenomegalie. Au loc depuneri de grăsimi în țesuturi (xantoame). Incidența aterosclerozei este scăzută.

*Hiperlipoproteinemia de tip II (hiperbetalipoproteinemie)*

Este datorată unei deficiențe (cantitative și calitative) a receptorilor membranari pentru LDL ceea ce duce la creșterea concentrației LDL ( $\beta$ -lipoproteine) și a colesterolului vehiculat de LDL. Totodată, diminuarea influenței de LDL în celule are ca rezultat și amplificarea sintezei endogene de colesterol, nu se mai manifestă acțiunea represivă a colesterolului exogen asupra HMG-CoA reductazei.

În stare homozigotă boala are un debut precoce cu depuneri de lipide în țesuturi (xantomatoză). Riscul pentru ateroscleroză este foarte ridicat. În forma IIa, forma pură a bolii, modificarea lipidică majoră este hipercolesterolemia, crește colesterolul-LDL. În forma IIb se adaugă și o creștere a VLDL, cu hipertrigliceridemie. Uneori forma IIa și IIb pot fi întâlnite la același bolnav, hipertrigliceridemia fiind intermitentă.

*Hiperlipoproteinemia de tip III (hiperlipoproteinemie familială mixtă, hiperlipoproteinemie cu bandă  $\beta$  lărgită)*

Tabloul lipidic sanguin este modificat în sensul unei creșteri, în general moderate, a colesterolului și trigliceridelor. Lipidograma cuprinde o bandă  $\beta$  largă, care acoperă și zona pre  $\beta$ . Aceasta s-ar datora formării unei lipoproteine anormale cu proprietăți comune LDL și VLDL ( $\beta$ -VLDL). Defectul biochimic al bolii este deficitul de apo-E sau sinteza unei proteine nefuncționale.

Boala se manifestă clinic la vîrsta adultă cu leziuni ateromatoase și risc crescut pentru accidente vasculare cerebrale și coronariene.

*Hiperlipoproteinemia de tip IV (hipertrigliceridemie majoră endogenă, hiperprebetalipoproteinemie)*

Boala se datorește unui dezechilibru între fluxul plasmatic de VLDL care transportă trigliceridele sintetizate endogen (din acizi grași obținuți prin sinteză de novo din glucoză) și capacitatea redusă de epurare plasmatică a VLDL. Nu se cunoaște unde este situat defectul metabolic.

Tabloul lipidic este modificat în sensul creșterii concentrației VLDL și a trigliceridelor; colesterolul este normal sau moderat crescut.

Manifestările clinice devin evidente la adult, fiind adesea asociate cu diabet, obezitate.

Modificările lipidice caracteristice hiperlipoproteinemiei de tip IV sînt comune cu acelea induse de toxice, alcoolism, consum exagerat de glucide.

*Hiperlipoproteinemia de tip V (hipertrigliceridemie majoră endogenă și exogenă, hiperprebetalipoproteinemie cu hiperchilomicronemie)*. Nu se cunoaște defectul metabolic al bolii. În această hiperlipoproteinemie trigliceridemia este crescută atât pe seama chilomicronilor (care transportă grăsimile exogene) cît și pe seama VLDL (care transportă trigliceridele endogene). Lipidemia crește după mese bogate în lipide și/sau glucide.

Manifestările clinice apar la vîrsta adultă, dureri abdominale, xantoame eruptive, hepatosplenomegalie. Risc crescut pentru boli vasculare aterosclerotice.

#### *Hipolipoproteinemiile familiale*

Deficitul congenital de  $\alpha$ -lipoproteine (deficit familial de HDL, boala Tangier). Boala este determinată de un deficit al sintezei de apo-A, component proteic al HDL. Concentrația plasmatică a HDL este redusă, ca și colesterolul-HDL și fosfolipidele.

În numeroase celule, macrofage, celule musculare netede, celule Schwann se acumulează colesterol. Boala se manifestă precoce, cu splenomegalie, anomalii neurologice, hipertrofie amigdaliană.

*Abetalipoproteinemia familială.* Este determinată de o sinteză defectuoasă (cantitativ sau calitativ) a apo-B și apo-C, apolipoproteine din chilomicroni și VLDL. Tabloul lipidic sanguin este modificat în sensul unei hipolipidemii totale, sint reduse trigliceridele, colesterolul, fosfolipidele. Sint absente lipoproteinele cu densitate  $< 1,063$  (LDL, VLD, chilomicroni).

Deficitul enzimatic la nivel intestinal are ca rezultat imposibilitatea formării chilomicronilor, a absorbției intestinale a trigliceridelor și a altor lipide exogene (malabsorbție lipidică). Tabloul clinic pe lângă manifestările digestive mai cuprinde tulburări neurologice, oftalmologice, hematologice determinate în cele din urmă de deficiența organismului în lipide.

### VIII.10. ICOSANOIZII

#### (PROSTAGLANDINE, TROMBOXANI, LEUCOTRIENE)

Această clasă este alcătuită din substanțe de natură lipidică, derivate din acizi grași nesaturați, cu un spectru larg de acțiuni biologice, de modulatori sau de mediatori ai semnalelor extracelulare. Toate țesuturile mamiferelor sintetizează prostaglandine ca răspuns la diverși stimuli, natura și concentrațiile locale ale diverselor prostaglandine sint implicate în fiziopatologia multor procese fundamentale ca vasomotricitatea, inflamația, tromboza, secreția gastrică, reproducerea, funcția renală, transmisia nervoasă.

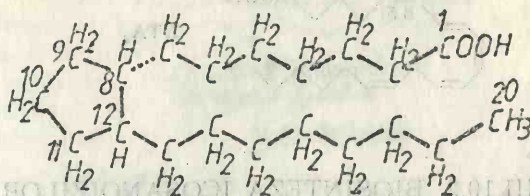
Termenul de prostaglandine a fost introdus în 1935 de von Euler pentru a descrie un material lipidic extras din lichidul seminal și care exercită acțiune contractilă asupra miometrului. Interesul pentru prostaglandine s-a amplificat vertiginos începînd din jurul anului 1960 odată cu perfecționarea tehnologiilor de cercetare a lipidelor. S-a stabilit multiplicitatea prostaglandinelor propriu-zise, natura lor chimică, diversitatea acțiunilor fiziologice și farmacologice, au fost descoperite noi clase de compuși. Toate aceste lipide active cuprind 20 atomi de carbon, ele derivă de la acizi grași  $C_{20}$  și au fost denumite „icosanoizi” (de la alcanul  $C_{20}H_{42}$ , icosan). Grupul icosanoizilor cuprinde:

- prostaglandinele „primare” sau „clasice” (PG);
- endoperoxizii prostaglandinici ( $PGG_2$ ,  $PGH_2$ );
- prostaciclina ( $PGI_2$ );
- tromboxanii (TX);
- leucotrienele (LT).



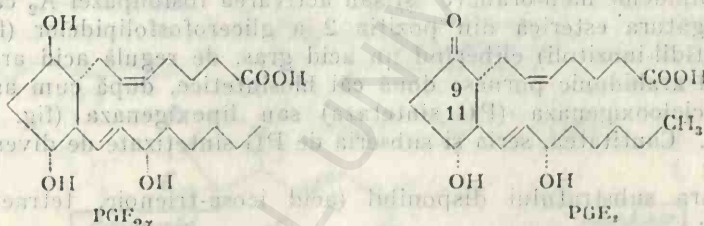
## VIII.10.1. STRUCTURĂ CHIMICĂ

Prostaglandinele sint, formal, derivați a unui acid gras  $C_{20}$ , ipotetic, acid prostanoic :

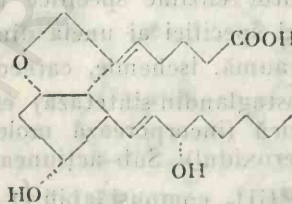


Diversele PG se deosebesc prin natura substituenților din nucleul pentanic (și unde este cazul prin izomeria geometrică  $\alpha/\beta$ ) și alcătuiesc seriile PGA-PGI. Catenele laterale se pot diferenția prin numărul dublelor legături, care este desemnat printr-un indice inferior PG<sub>1</sub>, PG<sub>2</sub>, PG<sub>3</sub>. La om cele mai abundente PG sint acelea din subseria 2 derivate din acidul arahidonic (acid  $\Delta^{5,8,11,14}$ -icosatetraenoic). Acidul  $\Delta^{8,11,14}$ -icosatrienoic (acid dihomog- $\gamma$ -linolenic) dă naștere la subseria PG<sub>1</sub>; de la un acid icosapentaenoic derivă subseria PG<sub>3</sub>.

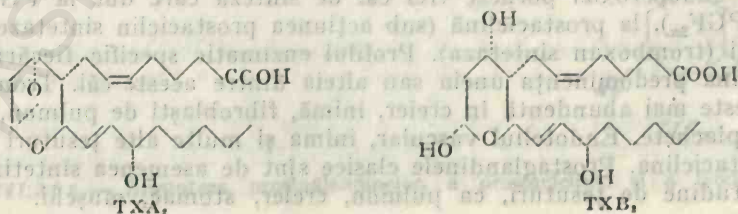
Dintre prostaglandinele primare, la om cele mai importante sint PGE<sub>2</sub> și PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  cu structurile :



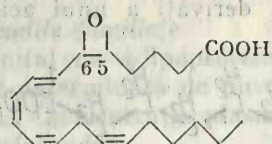
Prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) are structura :



Tromboxanii cuprind un heterociclu piranic (cu oxigen). TXA<sub>2</sub>, foarte instabil, trece ușor (enzimatic sau neenzimatic) în TXB<sub>2</sub>, prin hidroliza punții interne eterice :



Leucotrienele (LTA, LTB, LTC, LTD, LTE) sînt acizi grași  $C_{20}$  ce cuprind trei legături duble conjugate. Compusul cel mai activ este  $LTA_4$ :



$LTA_4$

## VIII.10.2. BIOSINTEZA ICOSANOIZILOR

Sinteza de icosanoizi are loc la nivelul tuturor țesuturilor, fiecare tip de celulă este aptă să sintetizeze una sau mai multe substanțe din această clasă. Icosanoizii, spre deosebire de alți mediatori chimici (hormoni, neurotransmițători), nu sînt depozitați în celule, ca atare sau sub formă de precursori, după sinteză sînt eliberați și acționează imediat. Sinteza de prostaglandine este declanșată de o diversitate foarte mare de stimuli (umoral, electrici, mecanici etc.) ce ajung la nivelul membranelor celulare. Prima etapă a cascadei de reacții care duce la sinteza și eliberarea de icosanoizi este o modificare a „stării fosfolipidelor membranare” și/sau activarea fosfolipazei  $A_2$  care atacă hidrolitic legătura esterică din poziția 2 a glicerofosfolipidelor (fosfatidilcoline, fosfatidilinozitol) eliberînd un acid gras, de regulă acid arahidonic. De la acidul arahidonic pornesc două căi biosintetice, după cum asupra lui acționează ciclooxigenaza (PG sintetaza) sau lipoxigenaza (fig. VIII.31a și VIII.31b). Cantitatea, seria și subseria de PG sintetizate de diverse celule depinde de:

- natura substratului disponibil (acid icosatrienoic, tetraenoic sau pentaenoic);
- echipamentul enzimatic celular, de balanță dintre ciclooxigenază și lipoxigenază, de prezența altor enzime specifice unora dintre ramificații;
- prezența de inhibitori specifici ai uneia dintre căi;
- natura stimulului, traumă, ischemie, catecolamine etc.

Ciclooxigenaza (sau prostaglandin-sintetaza) este o hemoproteină cu activitate dublă, dioxigenază (incorporează  $O_2$  în substrat) și peroxidază (descompune peroxidul). Sub acțiunea acestei enzime se obțin endoperoxizi ciclici,  $PGG_2$  și  $PGH_2$ , compuși labili ( $t_{1/2} = 5$  minute) din care rezultă PG clasice, prostaciclina și tromboxanii (fig. VIII.31a). Acești endoperoxizi au și ei activități biologice, sînt substanțe vasoactive foarte puternice.

De la endoperoxizi pornesc trei căi de sinteză care duc la PG clasice ( $PGE_2$  și  $PGF_{2\alpha}$ ), la prostaciclina (sub acțiunea prostaciclinsintetazei) și la tromboxani (tromboxansintetaza). Profilul enzimatic specific fiecărui țesut va determina predominanța uneia sau alteia dintre aceste căi. Tromboxansintetaza este mai abundentă în creier, inimă, fibroblaști de pulmon, splină, leucocite, plachete. Endotelul vascular, inima și multe alte țesuturi sintetizează prostaciclina. Prostaglandinele clasice sînt de asemenea sintetizate într-o multitudine de țesuturi, ca pulmon, creier, stomac, mușchi.



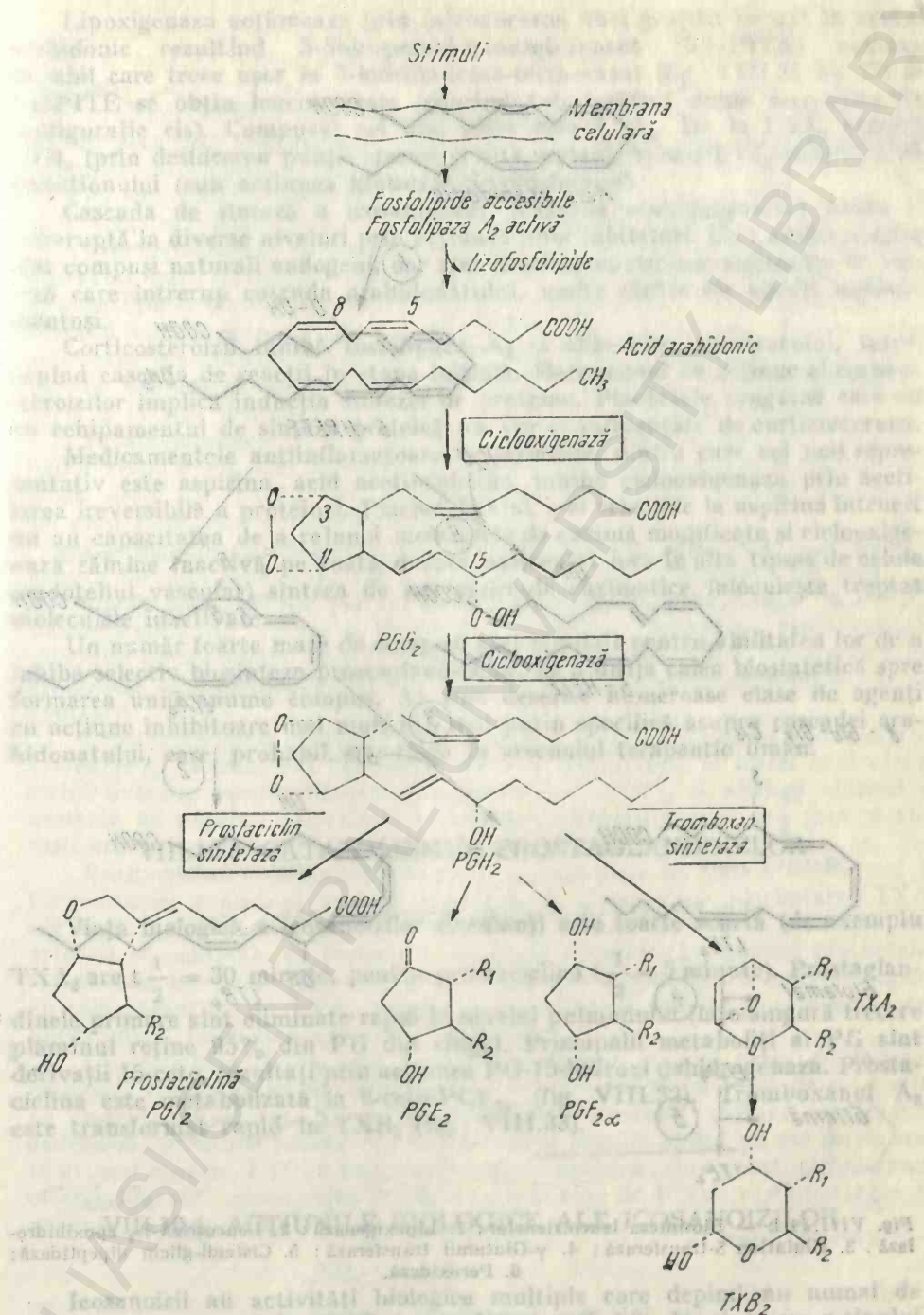


Fig. VIII.31 a — Biosinteza prostaglandinelor, a prostaciclinei și a tromboxanului.

Compușii LTC<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub> sunt acizi grași C<sub>20</sub> ce cuprind trei legături duble conjugate. Compușii mai activi este LTA<sub>4</sub>.

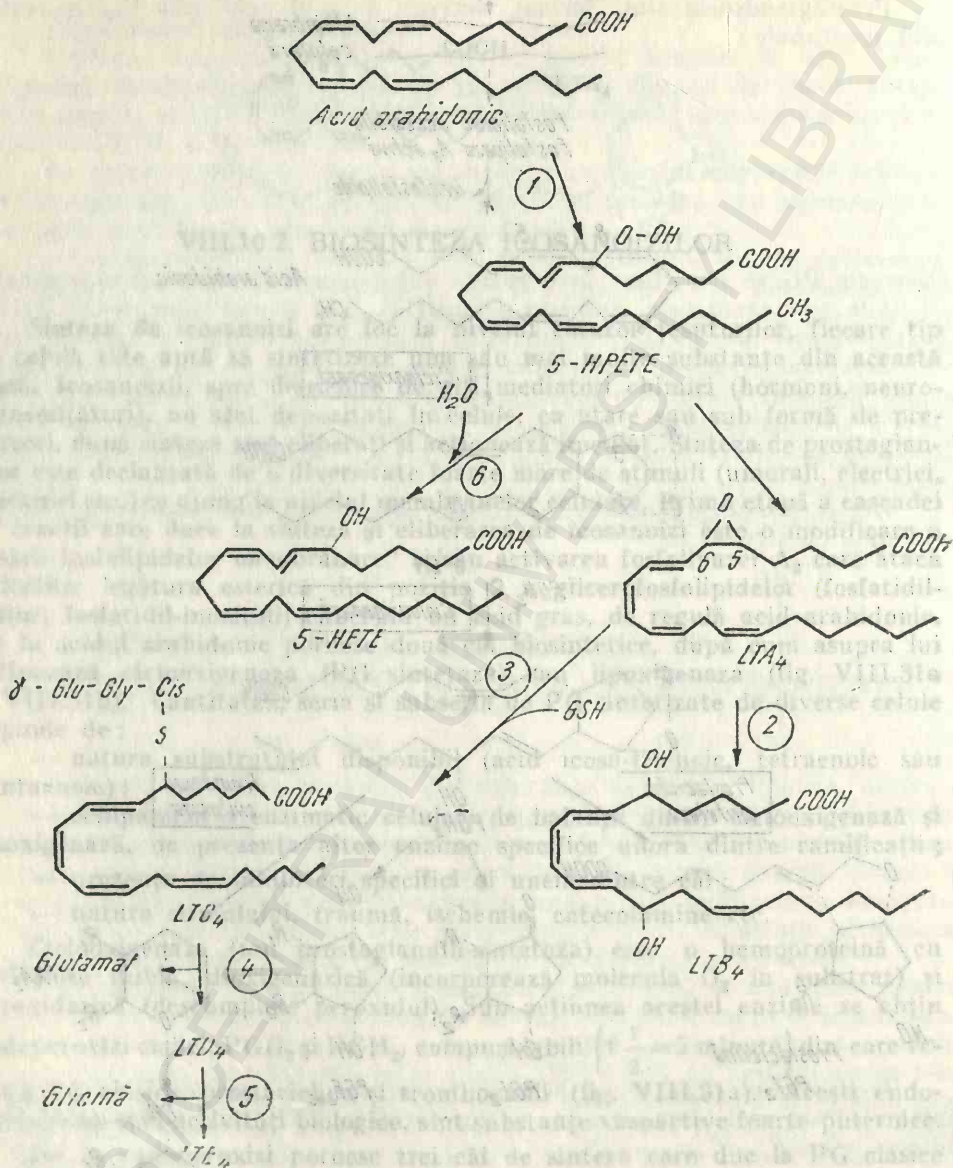


Fig. VIII.31 b — Biosinteza leucotrienelor; 1. Lipoxigenază; 2. Leucotrien A<sub>4</sub> epoxihidrolază; 3. Glutathion S-transferază; 4. γ-Glutamil transferază; 5. Cistenil-glicin dipeptidază; 6. Peroxidază.



Lipoxigenaza acționează prin introducerea unei grupări peroxi în acidul arahidonic rezultând 5-hidroperoxi-icosatetraenoat (5-HPITE) compus instabil care trece ușor în 5-hidroxi-icosa-tetra-enoat (fig. VIII.31 b). De la 5-HPITE se obțin leucotrienele (cuprind trei legături duble conjugate cu configurație cis). Compusul cel mai activ este  $\text{LTA}_4$ . De la  $\text{LTA}_4$  rezultă  $\text{LTB}_4$  (prin desfacerea punții eterice și alte remanieri) sau  $\text{LTC}_4$  prin fixarea glutatationului (sub acțiunea glutatation-S-transferazei).

Cascada de sinteză a icosanoizilor (cascada arahidonatului) poate fi întreruptă la diverse niveluri prin acțiunea unor inhibitori. Unii dintre aceștia sînt compuși naturali endogeni, dar sînt descrise numeroase substanțe de sinteză care întrerup cascada arahidonatului, multe dintre ele agenți medicamentoși.

Corticosteroidii inhibă fosfolipaza  $\text{A}_2$  și eliberarea substratului, întrerupînd cascada de reacții în etapa inițială. Mecanismul de acțiune al corticosteroidilor implică inducția sintezei de proteine. Plachetele sanguine care nu au echipamentul de sinteză proteică nu vor fi influențate de corticosteroidi.

Medicamentele antiinflamatoare nesteroidice, dintre care cel mai reprezentativ este aspirina, acid acetil-salicilic, inhibă ciclooxigenaza prin acetilarea ireversibilă a proteinei. Plachetele sînt mai sensibile la aspirină întrucît nu au capacitatea de a reinnoi moleculele de enzimă modificate și ciclooxigenaza rămîne inactivă pe toată durata existenței lor. În alte tipuri de celule (endoteliul vascular) sinteza de noi molecule enzimatice înlocuiește treptat moleculele inactivate.

Un număr foarte mare de compuși sînt studiați pentru abilitatea lor de a inhiba selectiv biosinteza prostaglandinelor, de a dirija calea biosintetică spre formarea unui anume compus. Au fost descrise numeroase clase de agenți cu acțiune inhibitoare mai mult sau mai puțin specifică asupra cascadei arahidonatului, care, probabil, vor intra în arsenalul terapeutic uman.

### VIII.10.3. CATABOLISMUL PROSTAGLANDINELOR

Viața biologică a icosanoizilor circulanți este foarte scurtă (de exemplu  $\text{TXA}_2$  are  $t \frac{1}{2} = 30$  minute, pentru prostaciclina  $t \frac{1}{2} = 3$  minute). Prostaglandinele primare sînt eliminate rapid la nivelul pulmonului (la o singură trecere plămînul reține 95% din PG din sînge). Principalii metaboliți ai PG sînt derivații 15-ceto, rezultați prin acțiunea PG-15-hidroxi dehidrogenaza. Prostaciclina este metabolizată la 6-ceto-PGF $_{1\alpha}$  (fig. VIII.32). Tromboxanul  $\text{A}_2$  este transformat rapid în  $\text{TXB}_2$  (fig. VIII.33).

### VIII.10.4. ACȚIUNILE BIOLOGICE ALE ICOSANOIZILOR

Icosanoizii au activități biologice multiple care depind nu numai de natura compusului, PGE, PGF, prostaciclina, TX, LT, dar și de cea a tipului celular, a speciei. Uneori în același tip de celulă acțiunile exercitate de către

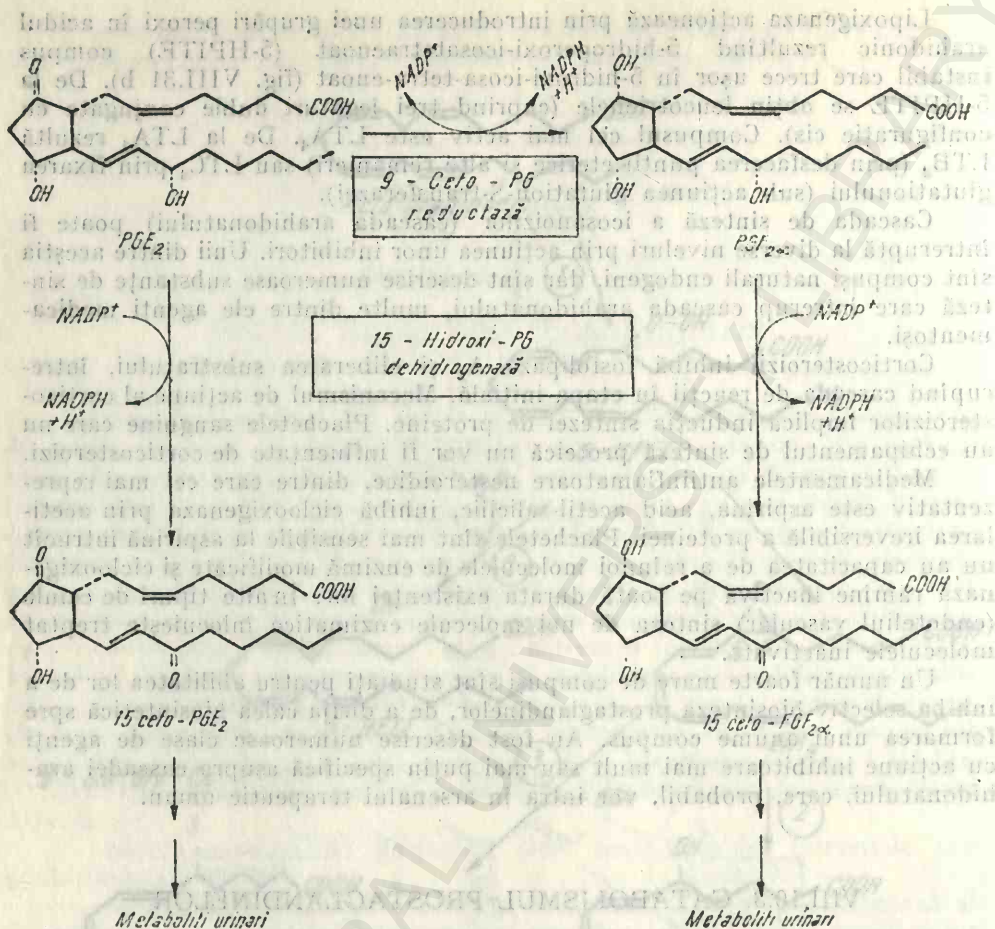


Fig. VIII.32 — Catabolismul prostaglandinelor.

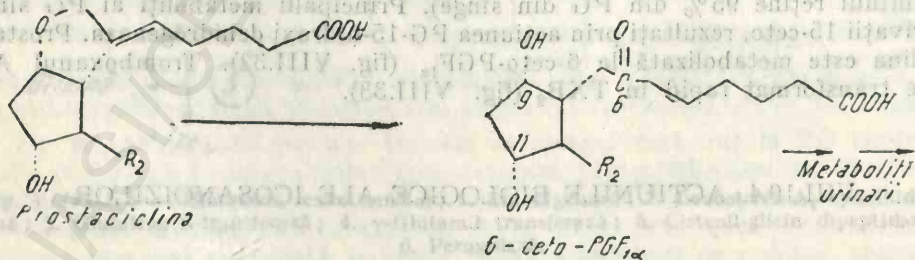


Fig. VIII.33 — Catabolismul prostacielinei.



unefe sau altele dintre prostaglandine sînt opuse (de exemplu contractă sau relaxează musculatura netedă, favorizează sau împiedică agregarea plachetară) și balanța dintre cele două efecte determină natura și amploarea răspunsului.

Prostaglandinele sînt mesageri chimici, sînt hormoni locali. Mecanismele ultime prin care se exercită acțiunea lor reglatoare nu sînt complet elucidate. În unele cazuri sînt incriminate variații ale concentrației nucleotidelor ciclice ( $\text{AMP}_c$  sau  $\text{GMP}_c$ ) modificări ale nivelului intracelular al ionilor  $\text{Ca}^{2+}$  sau activarea transcrierii genice și sinteza de proteine specifice.

Prostaglandinele primare se formează în cantități apreciable la nivelul tractului gastrointestinal influențînd motilitatea tubului digestiv, secreția și absorbția la nivelul diferitelor segmente ale acestuia.  $\text{PGF}_2$  are acțiune contractilă asupra musculaturii netede longitudinale și circulare, pe cînd  $\text{PGE}_2$  relaxează musculatura circulară.  $\text{PGE}_2$  are acțiune inhibitorie asupra secreției de suc gastric ca și asupra absorbției intestinale. Prostaglandinele din seria E au fost introduse în terapia umană ca agenți antiulcerogeni.

Prostaglandinele E și F au roluri deosebite în fiziologia plămînului, a căilor respiratorii, sînt implicate în stări patologice ca edem pulmonar, embolie, astm etc.  $\text{PGF}_{2x}$  are acțiune contractilă asupra traheei, bronhiilor, pe cînd  $\text{PGE}_2$  are acțiune bronhodilatatorie.

La nivelul sistemului renal, prostaglandinele joacă roluri reglatoare asupra fluxului renal sanguin, a excreției de sodiu și homeostaziei apei.

În sistemul nervos central prostaglandinele sînt implicate în procese fundamentale de reglare a transmisiei sinaptice, determină modificări ale nivelului nucleotidelor ciclice.  $\text{PGE}$  scade concentrația  $\text{GMP}_c$  cu efecte tranșilizante, anticonvulsionante, iar  $\text{PGF}_{2x}$  crește concentrația  $\text{GMP}_c$ , cu efecte contrare.

Prostaglandinele exercită roluri deosebite asupra sistemului reproducător. La bărbați, influențează spermatogeneza și fertilitatea, la femei controlează ciclul ovarian, contractibilitatea miometrului.  $\text{PGF}_{2x}$  și analogi chimici ai acestuia au acțiune contractilă asupra musculaturii netede din uter și sînt utilizate la declanșarea travaliului, în avortul terapeutic.

Prostaciclina și tromboxanul ( $\text{TXA}_2$ ) alcătuiesc un sistem de control al homeostaziei tonusului vaselor sanguine și al agregării plachetare.  $\text{TXA}_2$  are acțiune contractilă asupra musculaturii netede din vasele periferice, din arterele coronariene, de creștere a tensiunii arteriale. La nivelul plăchetelor favorizează agregarea și formarea trombusului. Prostaciclina are acțiuni opuse cu cele exercitate de  $\text{TXA}_2$ , relaxează musculatura vaselor și este un factor antitrombic, împiedică agregarea plachetelor.

Leucotrienele ( $\text{LTB}_4$  este probabil compusul cel mai activ) acționează ca agenți chemotactici și chemocinetici determinînd acumularea de neutrofile în focarul inflamator. La nivelul plămînului exercită acțiune contractilă asupra musculaturii netede din parenchim și bronhii avînd un rol important în astmul bronșic.  $\text{LTC}_4$  a fost identificat cu așa-zisa „slow reacting substance of anaphylaxis”, descoperită în urmă cu mai bine de 40 ani, răspunzătoare de producerea șocului anafilactic.

## Cap. IX. METABOLISMUL PROTEINELOR ȘI AL AMINOACIZILOR

### IX.1. INTRODUCERE

În orice organism viu proteinele constituie, din punct de vedere cantitativ, partea cea mai însemnată dintre compușii organici. Pe de altă parte, corespunzător diversității lor structurale, proteinele îndeplinesc funcții foarte variate și înalt specializate (vezi capitolul „Proteine“).

În condiții normale, proteinele din țesuturi și fluidele organismului sunt utilizate în foarte mică măsură pentru producere de energie; în înăniție, după epuizarea glucidelor și lipidelor de rezervă, catenele hidrocarbonate ale aminoacizilor din structura lor sunt degradate la  $\text{CO}_2$  și  $\text{H}_2\text{O}$ , asigurând, un timp, supraviețuirea. În ce privesc proteinele alimentare, dacă sunt în exces față de necesități, ele sunt utilizate în acest scop, fie pe cale directă (degradare la  $\text{CO}_2$  și  $\text{H}_2\text{O}$ ), fie pe căi indirecte reprezentate de gluconeogeneză și biosinteză de lipide. Organismele vii nu au capacitatea de a depozita proteine pentru necesități strict energetice.

Complexitatea metabolismului proteinelor derivă din faptul că pe lângă biosinteză și degradare, ele sunt utilizate pentru sinteza de către organism a unui număr însemnat de compuși organici azotați cu funcții specializate între care nucleotidele purinice și pirimidinice (inclusiv acizii nucleici), hormoni, alți factori de reglare, hemul, creatina etc.

În toate procesele menționate, legătura proteinelor cu constituenții lor — aminoacizii — este indisolubilă. De aceea metabolismul aminoacizilor face parte integrantă din metabolismul proteinelor.

Capitolul acesta cuprinde, într-o formă sintetică, aspectele menționate. Nu trebuie scăpat din vedere că biosinteza proteinelor, prezentată din anumite rațiuni mai înainte, constituie un aspect fundamental al metabolismului proteic.



## IX.2. STAREA DINAMICĂ A PROTEINELOR.

### BILANȚURI AZOTATE

Proteinele din organisme vii se reînnoiesc permanent. Pentru menținerea constantă a proporției lor în țesuturi, vitezele de sinteză și de degradare a proteinelor trebuie să fie egale, ceea ce constituie o stare dinamică staționară.

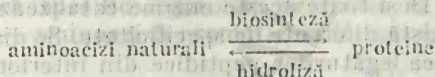
Vitezele de reînnoire a proteinelor se exprimă prin timpul de înjumătățire,  $T_{1/2}$ . La șobolan de ex.  $T_{1/2}$  pentru proteinele musculare este de cca 30 zile în timp ce pentru cele hepatice totale este de 5—6 zile. O serie de proteine hepatice, în special enzime, au însă  $T_{1/2}$  de ordinul orelor și chiar al minutelor (tabelul IX.1).

Tabelul IX.1

$T_{1/2}$  al unor enzime din ficat

Enzima	$T_{1/2}$ (ore)
Ornitin decarboxilază	0,2
$\delta$ -aminolevulinat sintetază	0,3
ARN polimeraza I	1,3
Triptofan oxigenază	2,5
Serin dehidratază	4,0
Glucokinază	12,0
Glucozo-6-fosfat dehidrogenază	15,0

Ecuația :



redă în linii mari legătura insolubilă între proteine și aminoacizi la nivelul organismelor vii. Însă, în timp ce proteinele se transformă cantitativ în aminoacizi, aceștia din urmă sînt numai în parte reutilizați pentru sinteza de proteine noi, cealaltă parte suferă fie degradări cu producere de amoniac, care este parțial recuperat și restul eliminat din organism (iar scheletul hidrocarbonat este oxidat), sau participă la sinteza altor compuși specializați; în locul lor la sinteza proteinelor sînt utilizați aminoacizii proveniți din proteinele alimentare și prin sinteză endogenă.

Bilanțul azotat al organismului reprezintă raportul între cantitatea de azot ingerat sub formă de proteine (sau alți compuși cu azot) și cantitatea de azot excretat prin urină sub formă de amoniac și uree (azotul eliminat prin fecale sub forma mai multor compuși, este, cantitativ, puțin față de cel urinar). Bilanțul este echilibrat dacă aportul exogen compensează pierderile, negativ ( $N_{\text{ingerat}} < N_{\text{excretat}}$ ), situație întâlnită în inanție, boli infecțioase, hemoragii, traumatisme, și pozitiv ( $N_{\text{ingerat}} > N_{\text{excretat}}$ ) situație întâlnită la organisme în creștere, în convalescență etc.

Cunoașterea bilanțurilor azotate are mare valoare pentru stabilirea necesarului zilnic de proteine în hrană (tabelul IX.2). În recomandările care se fac trebuie să se țină seama și de tipul de proteine din hrană ; proteinele cele mai valoroase sînt cele care conțin, în proporții cît mai apropiate, toată gama de aminoacizi necesari sintezei de proteine endogene.

Tabel IX.2

**Necesarul de proteine după recomandările Organizației Mondiale a Sănătății (OMS)**

Virsla	Necesarul de proteine în grame/kg corp/zi
0 — 3 luni	2,3
3 — 12 luni	1 — 2
1 — 15 ani	0,7 — 0,9
15 — 19 ani	0,65
Adult	0,60

### IX.3. DIGESTIA PROTEINELOR ALIMENTARE ȘI ABSORBȚIA AMINOACIZILOR

Ca și în cazul glucidelor și lipidelor, absorbția la nivelul intestinului a compușilor cu azot, reprezentați în cea mai mare parte de proteine, se face numai după degradarea lor hidrolitică. Eliberarea aminoacizilor din proteinele alimentare se face sub acțiunea combinată a enzimelor proteolitice din sucurile gastrice, pancreatice și intestinal. Deși toate aceste enzime catalizează hidroliza legăturilor peptidice, între ele există diferențe de specificitate. Se disting endopeptidaze — care asigură scindarea legăturilor peptidice din interiorul lanțurilor — și exopeptidaze care scindează numai legăturile peptidice formate de aminoacizii de la capete cu restul macromoleculei proteice sau peptidice. Tabelul IX.3 cuprinde principalele enzime proteolitice digestive.

O caracteristică a majorității enzimelor proteolitice digestive este că sînt secretate de celulele producătoare în forme inactive, numite proenzime sau zimogeni ; explicația ține pe de o parte de necesitatea de a intra rapid în acțiune (biosinteza lor necesitînd un anumit timp), pe de altă parte se protejează de acțiunea lor însăși celulele producătoare și canalele prin care sînt secretate. Activarea are loc prin detașarea — de la capete sau din interior — a unor oligopeptide, realizîndu-se, după caz, o demascare a centrului activ sau constituirea acestuia din starea preformată (vezi capitolul „Enzime“).

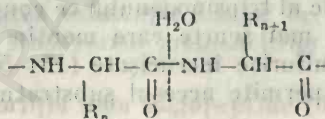
Pepsinogenul este produs de celulele „principale“ ale mîcuasei gastrice. Odată secretat în stomac, pepsinogenul este rapid activat la pepsină în prezența ionilor  $H^+$  și autocatalitic prin pepsină ; activarea constă în îndepărtarea a 42 resturi de aminoacizi de la capătul N-terminal al lanțului polipeptidic unic al pepsinogenului. Secreția de acid clorhidric este deci la fel de necesară ca și secreția pepsinogenului pentru digestia proteinelor în stomac.



## Enzimele proteolitice digestive

Sucul gastric	Proenzima	Enzima	Substratul	Produsii
Sucul gastric (pH 1,5–2,5)	Pepsinogen	Pepsină	Proteine	Poliptide
	"	Gastriesină	Proteine	Poliptide
	Prolabfermentul	Chimozina (Renina, Labfermentul)	Cazeina din lapte	Coagulează laptele
Sucul pancreatic (pH 7,5–8,0)	Tripsinogen	Tripsină	Poliptide	Poliptide și peptide
	Chimotripsinogen	Chimotripsină	Poliptide și peptide	Peptide
	Proelastază	Elastază	Elastina	Peptide și amino- acizi
	Pro-carboxipepti- daza	Carboxipepti- daza	Proteine, polipeptide	Poliptide, pep- tide și aminoacizi
Sucul intestinal (pH 6,2–7,3)	—	Amino-pep- tidaza	Peptide	Peptide și amino- acizi
	—	Dipeptidaze	Dipeptide	Aminoacizii

Pepsina acționează optim la pH în jur de 2; ea este o endopeptidază care atacă specific legăturile peptidice la care participă — prin grupările aminice — aminoacizii aromatici și în mai mică măsură metionina și leucina:



$\text{R}_{n+1}$  = fenilalanină, tirozină, metionină, leucină.

Gastriesina, numită și pepsină C, se formează alături de pepsină prin activarea într-un alt mod a pepsinogenului; pH-ul optim de acțiune al gastriesinei este ceva mai mare decât al pepsinei (~3), activitatea ei fiind predominantă la copii întrucât la aceștia sucul gastric are o aciditate ceva mai mică.

Chimozina este prezentă numai în sucul gastric al sugarilor. În prezența  $\text{Ca}^{2+}$  chimozina transformă cazeina în paracazeină care este apoi hidrolizată de pepsină.

În stomac, ca urmare a acțiunii hidrolitice specifice a pepsinei și gastriesinei, din proteine se obțin polipeptide și eventual oligopeptide, nu însă aminoacizi liberi.

Sucul pancreatic, care este secretat în intestinul subțire, conține tripsinogen, chimotripsinogen, proelastază și procarboxipeptidază. Primele trei sînt endopeptidaze, ultima este exopeptidază.

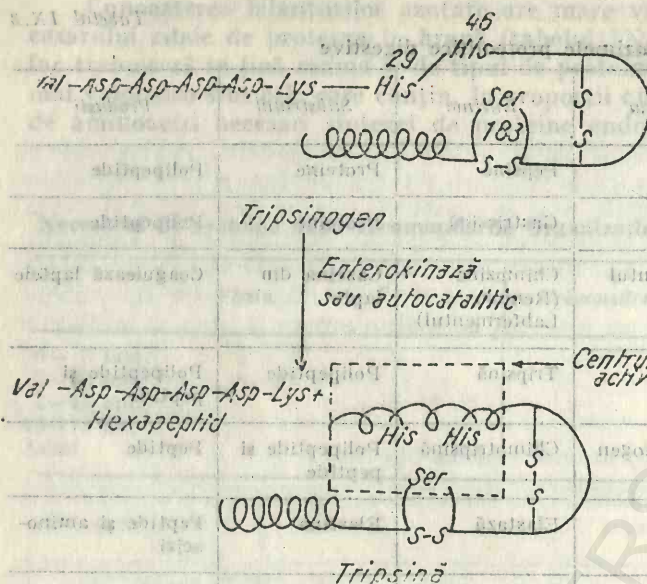


Fig. IX.1 — Ilustrarea transformării tripsinogenului în tripsină cu formarea centrului activ (care cuprinde cele două resturi de histidină și restul de serină).

Trypsinogenul este convertit la tripsină prin îndepărtarea, din capătul N-terminal, a unui hexapeptid; procesul are loc sub acțiunea enterokinazei, enzimă secretată de mucoasa intestinală, dar și autocatalitic. Prin îndepărtarea hexapeptidului molecula tripsinei se pliază, formându-se centrul activ în care se află His-29, His-46 și Ser-183 (fig. IX.1).

Trypsina hidrolizează legăturile peptidice la care participă — cu grupările carboxil — aminoacizii arginină și lizină.

Chimotripsinogenul este transformat în chimotripsină prin îndepărtarea a două dipeptide, proces care are loc sub acțiunea tripsinei și chimotripsinei. Din lanțul polipeptidic unic al tripsinogenului ce conține 245 resturi de aminoacizi, rezultă trei lanțuri mai scurte care mențin conformația zimogenului datorită unor legături disulfurice încrucișate (45—58; 168—182; 191—221). Prin „golerile” create se permite accesul substratului la centrul activ (fig. IX.2).

Chimotripsina asigură scindarea legăturilor peptidice la care participă — cu grupările carboxil — fenilalanina, tirozina și triptofanul.

Elastaza, care asigură hidroliza specifică a unor legături din elastină, se obține din proelastază sub acțiunea catalitică a tripsinei.

Procarboxipeptidaza se transformă în carboxipeptidază tot sub acțiunea tripsinei. Carboxipeptidaza asigură scindarea specifică a legăturilor peptidice la care participă — cu gruparea  $\text{NH}_2$ -aminoacizii C-terminali. Ea este deci o exopeptidază.

Definitivarea hidrolizei se realizează prin acțiunea enzimelor produse la nivelul intestinului subțire; aminopeptidaza (și ea o exopeptidază), scindează specific aminoacizii din capetele N-terminale ale peptidelor, iar dipeptidazele, care acționează chiar la nivelul enterocitelor, asigură ruperea ultimelor legături peptidice.



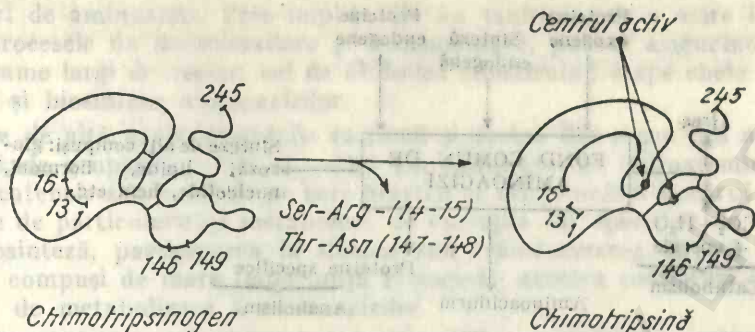


Fig. IX.2 — Formarea chimotripsinei din chimotripsinogen; cele două dipeptide îndepărtate sub acțiunea tripsinei și chimotripsinei sînt Ser-Arg (14—15) și Thr-Asn (147—148).

Absorbția aminoacizilor are loc la nivelul intestinului subțire; aici ei sînt preluați, în formă liberă, de singele portal care îi transportă în ficat. Ficatul utilizează o bună parte din aminoacizi pentru sinteza proteinelor proprii și a proteinelor serice. Restul de aminoacizi este distribuit, prin circulația sistemică, celorlalte țesuturi.

Absorbția propriu-zisă a aminoacizilor se realizează doar într-o mică măsură prin difuzie; transportul mediat de proteine specializate, numite translocaze, este forma principală. Se admite în prezent că există cîteva translocaze de grup: 1) pentru aminoacizi neutri cu moleculă mică; 2) pentru aminoacizi neutri cu molecule mari; 3) pentru aminoacizi bazeici; 4) pentru aminoacizi cu caracter acid și 5) pentru prolină.

Translocazele seamănă în multe privințe cu enzimele: prezintă fenomenul de saturare cu substrat, sînt susceptibile la acțiunea unor inhibitori etc.

Caracteristicile absorbției aminoacizilor mai sînt și consumul de energie (transport activ) și necesitatea existenței ionilor de  $\text{Na}^+$  în mediul extern; din acest punct de vedere transportul aminoacizilor seamănă cu cel al glucozei.

Se menționează că absorbția unor oligopeptide (de ex. dipeptide) și chiar a unor proteine nu este total exclusă. Altfel nu se pot explica anumite date experimentale cum ar fi răspunsul imun la unele proteine administrate pe calea digestivă.

## IX.4. FONDUL METABOLIC COMUN DE AMINOACIZI. AMINOACIZI ESENȚIALI ȘI NEESSENȚIALI

Totalitatea aminoacizilor liberi existenți la un moment dat în organism, în special în fluidele acestuia, constituie fondul metabolic comun de aminoacizi. Constituirea acestui fond se face prin aminoacizii proveniți din proteinele alimentare, a hidrolizei proteinelor tisulare, precum și prin sinteza endogenă

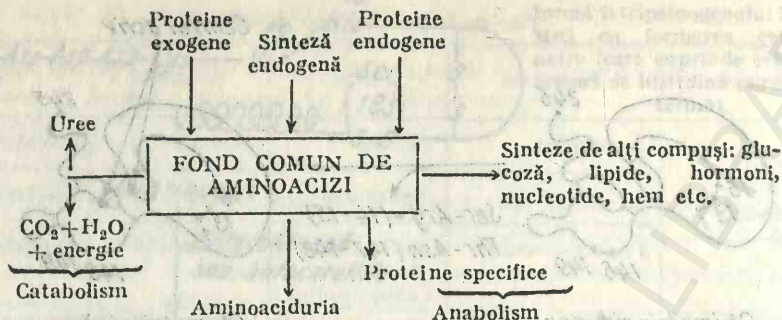


Fig. IX.3 — Constituirea și utilizarea fondului metabolic comun de aminoacizi.

a unora dintre ei din compuși de natură neproteică. În fondul comun nu există distincție după proveniență.

Dinamica fondului comun a aminoacizilor constă în concurența între procesele prin care ei se produc și cele prin care se consumă sau se îndepărtează. Din fondul metabolic comun, fiecare țesut (celulă) își extrage tipul și cantitatea aminoacizilor necesari în momentul dat. Principala utilizare este pentru biosinteza proteinelor, la acest proces participând toți aminoacizii naturali. Pe de altă parte, diverși aminoacizi sunt utilizați în gluconeogeneză, sinteză de lipide și compuși specializați menționați anterior; catabolizarea — proces permanent dar variabil ca intensitate — și eliminarea lor (în cantități mici) prin urină sunt alte modalități de consum a aminoacizilor (fig. IX.3).

Dacă prin hidroliza proteinelor alimentare și a celor endogene se furnizează fondului comun toată gama de aminoacizi naturali, sinteza endogenă din compuși neproteici nu este posibilă decât în cazul unora dintre aceștia. Organismul uman nu este în măsură să sintetizeze scheletul atomilor de carbon al unui număr de opt aminoacizi naturali; ei se numesc „aminoacizi esențiali” și se procură în special din alimente: valina, leucina, izoleucina, lizina, metionina, treonina, fenilalanina, triptofanul. În perioada de creștere, organismul are nevoie și de cantități mai mari, decât poate sintetiza, de histidină și arginină; ei se numesc „semiesențiali”.

## IX.5. CĂI GENERALE ȘI PARTICULARE DE CATABOLIZARE A AMINOACIZILOR

Caracteristica structurală comună a aminoacizilor naturali este prezența pe același atom de carbon (C $\alpha$ ) a unei grupări carboxil și a unei grupări amino. Prin intermediul acestor grupări aminoacizii se condensează formând peptide, polipeptide, iar *in vivo* proteine. Deoarece la biosinteza de proteine participă toți cei 20 de aminoacizi naturali (cap. I) acest proces constituie o cale generală de metabolizare a lor. Pe lângă biosinteza proteinelor există și alte căi metabolice în care sunt implicați toți aminoacizii sau care sunt comune unor



grupuri de aminoacizi. Prin implicațiile lor multiple, de o mare importanță sînt procesele de decarboxilare și transaminare, primul asigurînd formarea unei game largi de amine, cel de al doilea constituînd etape cheie în catabolismul și biosinteza aminoacizilor.

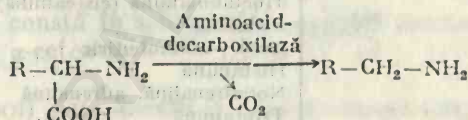
Pe de altă parte, grupările carboxil și amino din  $\alpha$  sau din alte poziții, alături de grupările  $-\text{SH}$  și  $-\text{OH}$  (în cazul tio- și hidroxiaminoacizilor), cit și catenele sau nucleele pe care acestea se află, conferă fiecărui aminoacid o serie de particularități metabolice, de exemplu căi specifice de degradare, de biosinteză, participarea la sinteza sau transformarea directă într-o serie de compuși de mare importanță biologică; acestea constituie căile particulare de metabolizare a aminoacizilor.

În continuare se tratează transformările generale ale aminoacizilor în contextul unor căi de degradare sau de biosinteză, cit și unele dintre transformările specifice ale aminoacizilor.

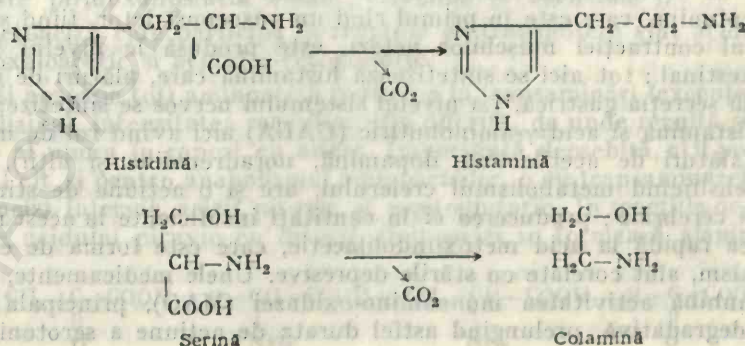
### IX.5.1. DECARBOXILAREA AMINOACIZILOR;

#### AMINE BIOGENE

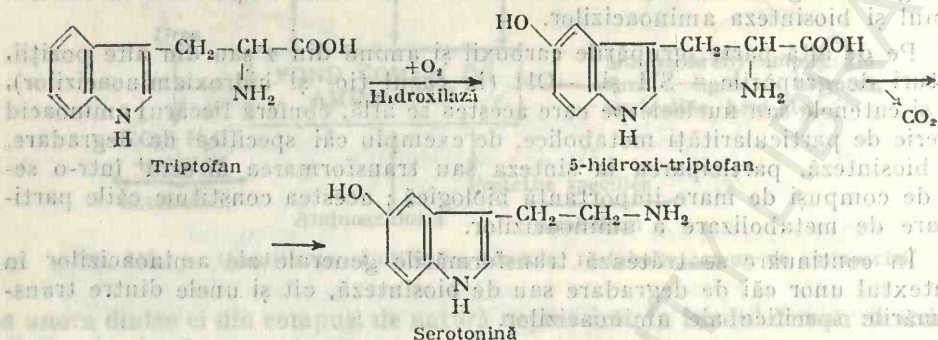
Un număr destul de mare de aminoacizi suferă, în țesuturi, decarboxilări; se formează aminele primare corespunzătoare numite amine biogene; reacțiile sînt catalizate de aminoacid-decarboxilaze specifice a căror coenzimă este piridoxalfosfatul (decarboxilarea are loc sub forma complexului de tip bază Schiff a aminoacidului cu coenzima, vezi „Vitamine și coenzime“):



De exemplu din histidină, se obține histamină iar din serină se obține colamină (etanolamină):



Uneori decarboxilarea este încadrată într-o secvență de reacții; este cazul biosintezei catecolaminelor din tirozină (vezi cap. hormoni) și a serotoninei (5-hidroxitriptamină) din triptofan:



Aminele biogene au roluri numeroase: colina și colamina sînt constituenți ai unor lipide complexe (lecitine, cefaline),  $\beta$ -alanina și tioetanolamina se află în structura CoA, noradrenalina și adrenalina sînt hormoni, iar putresceina și cadaverina participă la reglarea replicării ADN și a biosintezei proteinelor. Principalele amine biogene sînt cuprinse în tabelul IX.4.

Tabelul IX.4

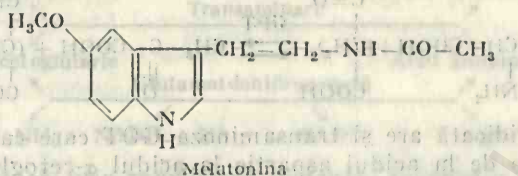
Amine biogene importante și aminoacizii din care se formează

Aminoacidul	Amina biogenă
Lizină	Cadaverina
Ornitină	Putresceina
Arginină	Agmatina
Serină	Colamină, colină
Cisteină	Tioetanolamină (cisteamină)
Acid aspartic	$\alpha$ -alanină
Acid glutamic	Acid $\gamma$ -aminobutiric
Histidină	Histamină
Tirozină	Noradrenalină, adrenalină
Triptofan	Triptamină

Acidul  $\gamma$ -aminobutiric, histamina și serotonină sînt amine reglatorii cu importanță cel puțin egală cu a adrenalinei și noradrenalinei, dar, spre deosebire de acestea, sînt sintetizate la nivelul țesuturilor unde acționează. Astfel serotonină, care este în primul rînd un vasoconstrictor, fiind și un stimulator al contracției mușchilor netezi, este produsă la nivelul tractului gastro-intestinal; tot aici se sintetizează histamina care, alături de gastrină, stimulează secreția gastrică. La nivelul sistemului nervos se sintetizează serotonină, histamină și acid  $\gamma$ -aminobutiric (GABA) aici avînd rol de mediatori chimici (alături de acetilcolină, dopamină, noradrenalină și alții). Serotonina, intensificînd metabolismul creierului, are și o acțiune de stimulare a activității cerebrale; producerea ei în cantități insuficiente la acest nivel sau degradarea rapidă la acid metoxiindolilacetic, care este forma de eliminare din organism, sînt corelate cu stările depresive. Unele medicamente, ca ipro-niazida, inhibă activitatea monoamino-oxidazei (MAO), principala enzimă în calea degradativă, prelungind astfel durata de acțiune a serotoninei.



În glanda pineală și nervii periferici, serotonina este metilată și acilată formându-se hormonul 5-metoxi-N-acetilserotonină sau melatonină care, blocând acțiunea hormonului melanocitar, împiedică colorarea melanocitelor; melatonina blochează și acțiunea ACTH.

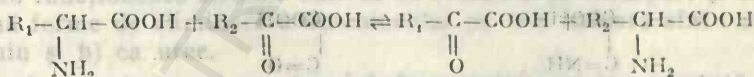


## IX.5.2. CATABOLISMUL AZOTULUI AMINOACIZILOR. TRANSAMINAREA ȘI DEZAMINAREA OXIDATIVĂ

Prin degradarea oxidativă completă din aminoacizi se obțin amoniac, dioxid de carbon și apă. Procesul, a cărui intensitate depinde de numeroși factori între care conținutul în glucide, lipide și proteine al alimentelor, nevoile energetice ale organismului, intensitatea degradării proteinelor tisulare și mulți alții, se realizează în etape, în următoarea ordine: (1) dezaminarea, (2) degradarea scheletului hidrocarbonat cu formarea de intermediari glicolitici sau ai ciclului acizilor tricarboxilici, și (3) formarea de  $\text{CO}_2$  și  $\text{H}_2\text{O}$ .

Dezaminarea constă în îndepărtarea, sub formă de amoniac, a grupărilor amino din pozițiile  $\alpha$  ale aminoacizilor. La realizarea acestui proces concurează reacții de transaminare și dezaminare oxidativă. În aceste reacții un rol esențial îl are acidul glutamic. Sedul acestor transformări este: ficatul, rinichii, inima, mușchii, creierul.

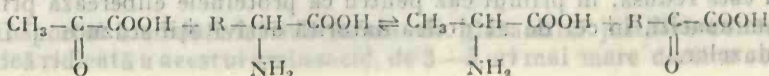
Transaminarea constă în schimbul de grupări amino cu grupări carbonil între aminoacizi și  $\alpha$ -cetoacizi:



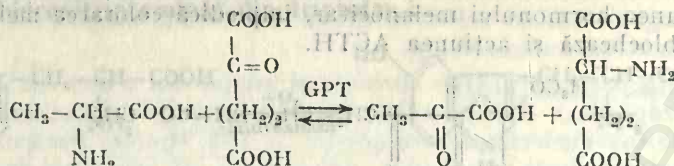
Reacțiile de transaminare sînt complet reversibile. Coezima transaminazelor este piridoxalfosfatul (vezi „Vitamine și coenzime“).

$\alpha$ -Cetoacizii care participă la reacțiile de transmitere sînt acidul piruvic, acidul oxaloacetic și acidul  $\alpha$ -cetoglutaric.

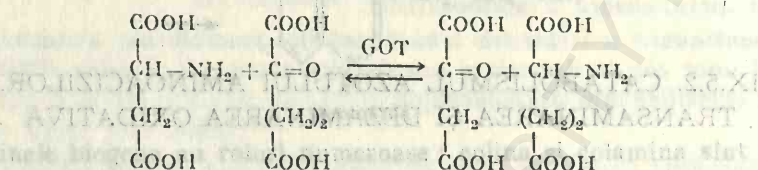
Deși aproape toți aminoacizii participă la transaminări (excepție fac treonina și lizina), intensitatea reacțiilor este diferită, de unde rezultă și rolul primordial al unora în raport cu altele. Importanță deosebită, atât pentru catabolismul cit și pentru anabolismul aminoacizilor, o au transaminazele, în care ca cetoacizi intervin acizii piruvic și  $\alpha$ -cetoglutaric. În reacțiile de transaminare ale acidului piruvic cu diverși aminoacizi se formează alanina:



Într-o reacție de transaminare catalizată de GPT (a cărei activitate este ridicată) pe seama grupărilor amino din alanină se formează acid glutamic:

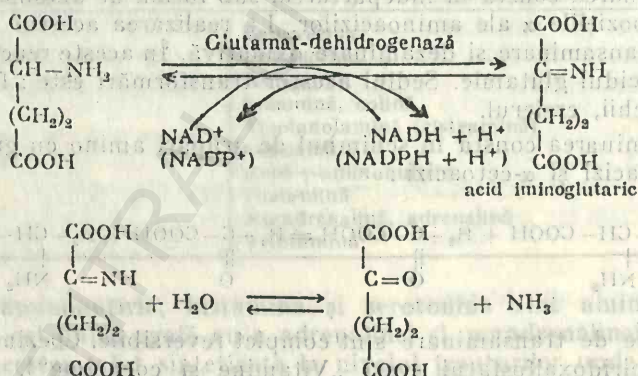


Activitate ridicată are și transaminaza GOT care catalizează transferul grupărilor amino de la acidul aspartic la acidul  $\alpha$ -cetoglutaric:



Astfel acidul  $\alpha$ -cetoglutaric, care este intermediar al ciclului acizilor tricarboxilici, este un adevărat „colector” de grupări amino (cu formare de acid glutamic).

Acidul glutamic format este dehidrogenat sub acțiunea glutamatdehidrogenazei formându-se acidul iminoglutaric; acesta reacționează spontan cu apa rezultând acid  $\alpha$ -cetoglutaric și amoniac. Împreună, cele două reacții constituie ceea ce se numește „dezaminarea oxidativă” a acidului glutamic:

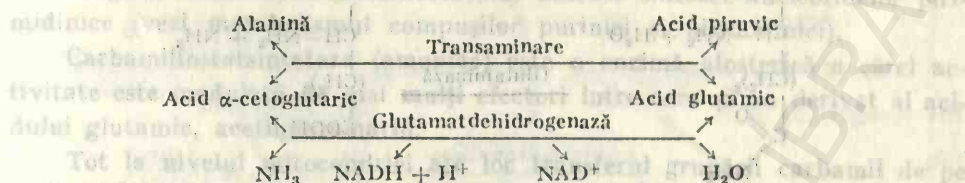


După cum rezultă din prima reacție, coenzima glutamatdehidrogenazei poate fi atât  $\text{NAD}^+$  cât și  $\text{NADP}^+$ . Această caracteristică, alături de faptul că reacția este reversibilă și că activitatea enzimei este influențată de numeroși efectori au deosebită valoare și pentru procesul invers, de biosinteză a aminoacizilor.

Reacții asemănătoare celei catalizate de glutamatdehidrogenază mai au loc și sub acțiunea D-aminoacidoxidazelor (cu coenzimă FAD) și L-aminoacidoxidazelor (cu coenzimă FMN); totuși, contribuția lor la formarea amoniacului este redusă, în primul caz pentru că proteinele eliberează prin hidroliză L-aminoacizi, în cel de al doilea datorită activității scăzute a L-aminoacidoxidazelor.



Din cuplarea transaminărilor cu dezaminarea oxidativă a acidului glutamic rezultă un proces ciclic care produce amoniac și regenerează acidul  $\alpha$ -cetoglutaric; procesul este numit transdezaminare:



Se menționează că prin reoxidarea în lanțul respirator a  $\text{NADH} + \text{H}^+$ , care se formează în cursul transdezaminării, se produce energie; ea se adaugă la cea eliberată prin degradarea catenelor de carbon ale aminoacizilor.

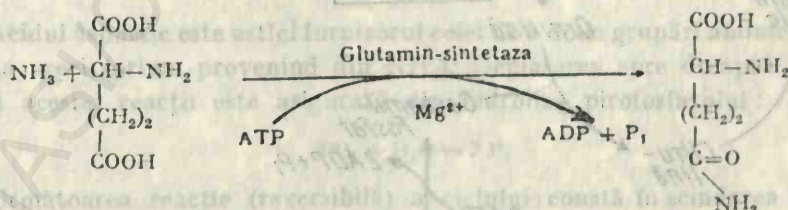
### IX.5.3. METABOLISMUL AMONIACULUI.

#### FORMAREA ȘI ELIMINAREA UREEI

Pe calea transdezaminării, în organismele animale se produce cea mai mare parte din amoniac. Cantități mici de amoniac, compus deosebit de toxic în special pentru celulele nervoase, se mai formează și prin oxidări ale aminelor, hidroliza grupărilor amidice ale asparaginei și glutaminei, hidroliza urcei prezente în secrețiile tubului digestiv, degradarea sub acțiunea florei microbiene a resturilor de proteine din intestin; amoniacul produs la nivelul intestinului este absorbit și transportat prin sistemul port la ficat.

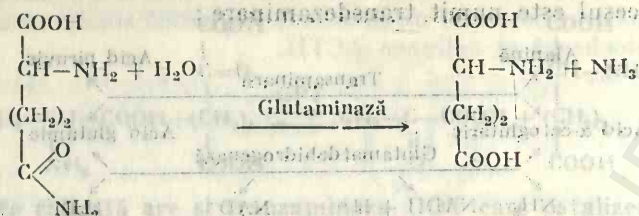
Amoniacul produs la nivelul țesuturilor este reutilizat în parte pentru sinteza de aminoacizi, în special prin parcurgerea în sens invers a reacției catalizate de glutamatdehidrogenază (aspect asupra căruia se va reveni). Pentru îndepărtarea rapidă a amoniacului care nu se reutilizează, în organismul uman funcționează sisteme extrem de eficiente de transport și eliminare. Cele două forme de eliminare a amoniacului pe cale urinară sînt: a) ca ioni de amoniu și b) ca uree.

Numai o cantitate extrem de mică de amoniac este transportată în singe în formă liberă, fapt reflectat de concentrația plasmatică redusă (10—20  $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ). Cea mai mare parte este vehiculată sub formă de glutamină care se obține din acidul glutamic și amoniac în prezența glutaminsintetazei, enzimă prezentă în toate celulele;



Transportul amoniacului sub formă de glutamină justifică concentrația plasmatică ridicată a acestui aminoacid, de 3—5 ori mai mare decît a celorlalți.

Ficatul și rinichiul, care captează glutamina din sânge, dispun de glutaminază, enzima ce catalizează hidroliza ireversibilă a glutaminei:



Reacțiile catalizate de glutaminsintetază și glutaminază sînt practic ireversibile. Ele alcătuiesc un cuplu ce acționează asemănător glucokinazei și glucozo-6-fosfatazei în fosforilarea și defosforilarea glucozei.

Amoniacul format în rinichi difuzează prin membrana celulelor tubulare și, acceptînd protoni, dă naștere ionului de amoniu. Eliminarea sub această formă a unei părți a amoniacului prezintă importanță și în legătură cu menținerea rezervei alcaline a plasmei (vezi „Rinichiul și urina”).

Amoniacul eliberat din glutamină în ficat, la care se adaugă amoniacul adus de sângele portal de la intestin, este transformat de acest organ în uree. Cîrca 80—90 % din totalul amoniacului este transformat în acest compus, care se elimină tot prin urină.

Formarea ureei are loc în cadrul unei secvențe ciclice de reacții cunoscută sub numele de ciclul ureogenetic sau ciclul Krebs-Henseleit; unele dintre reacțiile ciclului se desfășoară în mitocondriile hepatocitelor, altele în citosol (fig. IX.4).

Ciclul ureogenetic debutează prin condensarea, în interiorul mitocondriilor, a amoniacului cu  $\text{CO}_2$  și ATP, reacție catalizată de carbamilfosfatsintetază (amoniac):

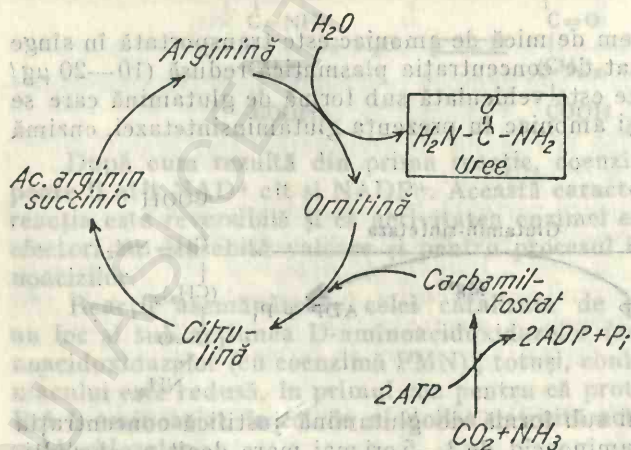
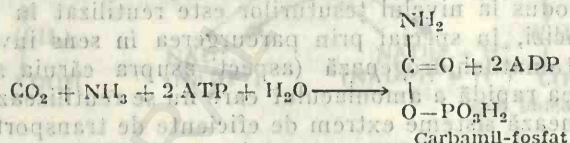


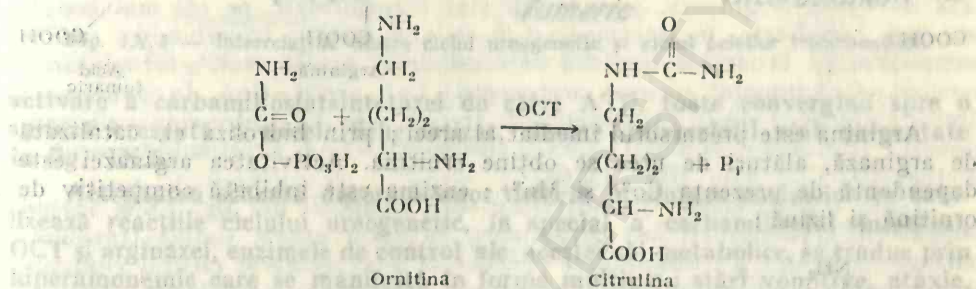
Fig. IX.4 — Schema generală a ciclului ureogenetic.



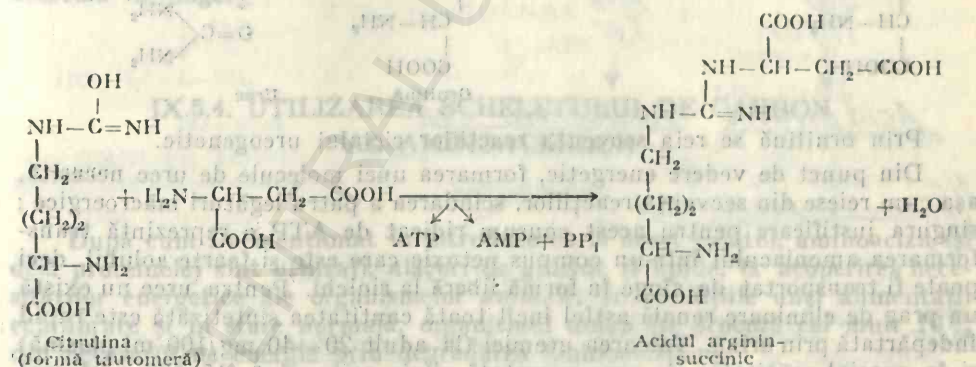
La numele enzimei s-a adăugat (amoniac) pentru a o deosebi de enzima similară localizată în citosol, numită carbamilfosfat sintetază (glutamină), care asigură formarea carbamilfosfatului necesar sintezei nucleotidelor pirimidinice (vezi metabolismul compușilor purinici și pirimidinici).

Carbamilfosfatsintetaza (amoniac) este o enzimă alosterică a cărei activitate este modulată de mai mulți efectori între care și un derivat al acidului glutamic, acetilglutamatul.

Tot la nivelul mitocondriei are loc transferul grupării carbamil de pe carbamil fosfat pe ornitină; în această reacție, catalizată de ornitin-carbamil-transferază (OCT), se formează citrulina:



În citosol, unde ajunge prin simplă difuziune, citrulina se condensează cu acidul aspartic în prezența arginin-succinat sintetazei; se formează acidul argininsuccinic:

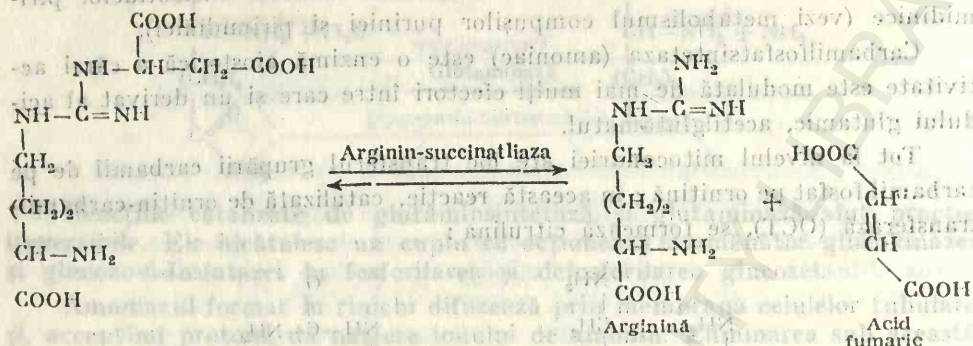


Acidul aspartic este astfel furnizorul celei de a doua grupări aminice pentru sinteza ureei (prima provenind din  $\text{NH}_3$ ). Deplasarea spre dreapta a echilibrului acestei reacții este asigurată din hidroliza pirofosfatului:

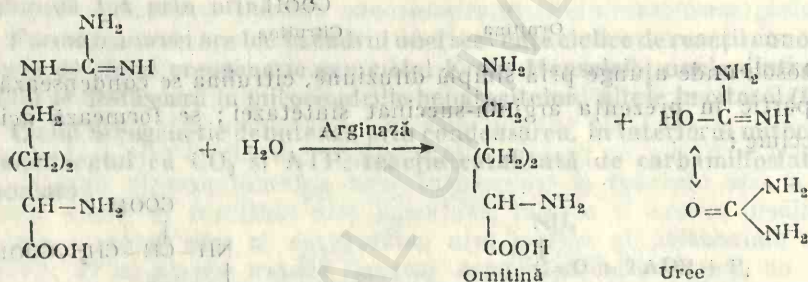


Următoarea reacție (reversibilă) a ciclului constă în scindarea acidului arginin-succinic în arginină și acid fumaric; enzima, arginin-succinatliaza, prin specificitatea stereochemică, exclude formarea acidului maleic (izome-

rul acidului fumaric). Acidul fumaric poate fi convertit în acid oxalacetic (sub acțiunea catalitică a fumarazei și malatdehidrogenazei), care va regenera prin transaminare acidul aspartic :



Arginina este precursorul imediat al ureei ; prin hidroliza ei, catalizată de arginază, alături de uree se obține ornitina. Activitatea arginazei este dependentă de prezența  $\text{Co}^{2+}$  și  $\text{Mn}^{2+}$  ; enzima este inhibată competitiv de ornitină și lizină ;



Prin ornitină se reia secvența reacțiilor ciclului ureogenetic.

Din punct de vedere energetic, formarea unei molecule de uree necesită, așa cum reiese din secvența reacțiilor, scindarea a patru legături macroergice ; singura justificare pentru acest consum ridicat de ATP o reprezintă transformarea amoniacului într-un compus netoxic care este și foarte solubil, deci poate fi transportat de sine în formă liberă la rinichi. Pentru uree nu există un prag de eliminare renală astfel încât toată cantitatea sintetizată este rapid îndepărtată prin urină. Valoarea uremiei (la adult 20—40 mg/100 ml plasmă) și în special cantitatea de uree excretată zilnic prin urină (15—30 g/24 ore) reflectă deosebita intensitate cu care se desfășoară ciclul ureogenetic, pe plan mai general intensitatea catabolismului proteic.

Între ciclul ureogenetic și ciclul acizilor tricarboxilici există o strânsă legătură ; relația prin intermediul acidului fumaric (cu regenerarea acidului aspartic) s-a menționat ceva mai înainte. Pe de altă parte, oxidarea în ciclul Krebs a  $\alpha$ -cetoglutaratului favorizează deplasarea în sensul formării amoniacului a echilibrului reacției catalizată de glutamatdehidrogenază și — prin cuplarea cu lanțul respirator — formarea unei cantități crescute de ATP. La disponibilitatea de amoniac și ATP astfel create se adaugă efectul de



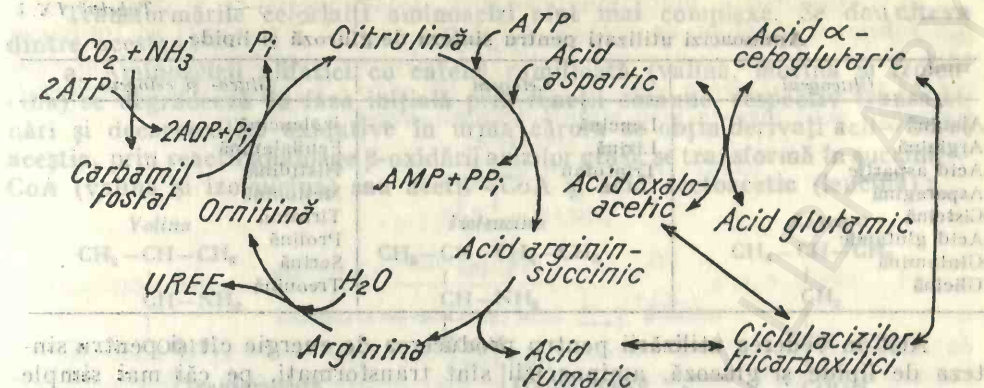


Fig. IX.5 — Interrelațiile dintre ciclul ureogenetic și ciclul acizilor tricarboxilici.

activare a carbamilfosfat-sintetazei de către ATP, toate convergind spre o sinteză crescută a ureei. Schematizat, aceste interrelații sînt prezentate în fig. IX.5.

Activitatea scăzută datorată unor defecte în sinteza enzimelor ce catalizează reacțiile ciclului ureogenetic, în special a carbamilfosfat-sintetazei, OCT și arginazei, enzimele de control ale acestei căi metabolice, se traduc prin hiperamonemie care se manifestă în forme multiple: stări vomitive, ataxie, iritabilitate, letargie și întirzierea dezvoltării mintale. Se pot aduce unele ameliorări printr-un regim alimentar sărac în proteine și prin adăul la acesta a unor  $\alpha$ -cetoacizi; ei vor folosi amoniacul pentru a-l încorpora în aminoacizi utilizabili în biosinteza proteinelor, scăzînd astfel concentrația acestuia în sînge.

#### IX.5.4. UTILIZAREA SCHELETULUI DE CARBON AL AMINOACIZILOR

După cum s-a menționat în introducerea la acest capitol, aminoacizii (și deci proteinele) sînt utilizați, alături de glucide și lipide, la acoperirea necesităților energetice ale organismelor animale. În condițiile unei alimentații echilibrate și în stare normală, organismul uman își procură cel mult 10% din necesarul de energie prin degradarea aminoacizilor.

Pentru producerea de energie, scheletul de atomi de carbon al aminoacizilor este degradat oxidativ la  $\text{CO}_2$  și  $\text{H}_2\text{O}$ . Studii efectuate cu aminoacizi marcați au scos însă în evidență că atomii de carbon din scheletul lor se regăsesc nu numai în  $\text{CO}_2$  ci și în structura glucozei și lipidelor sintetizate endogen. Participarea unui număr însemnat de aminoacizi la gluconeogeneză și sinteza de lipide a fost prezentată (capitolele de metabolism glucidic și lipidic). Aminoacizii din care se sintetizează glucoză se numesc glucogeni, cei din care se sintetizează lipide se numesc cetogeni. Unii aminoacizi sînt atît glucogenici cît și cetogenici (tabelul IX.5).

## Aminoacizi utilizați pentru sinteza de glucoză și lipide

Glucogeni	Cetogeni	Gluco- și cetogeni
Alanină Arginină Acid aspartic Asparagină Cisteină Acid glutamic Glutamină Glicină	Leucină Lizină Triptofan	Izoleucină Fenilalanină Histidină Metionină Tirozină Prolină Serină Treonină

Atât în vederea utilizării pentru producerea de energie cit și pentru sinteza de lipide și glucoză, aminoacizii sint transformați, pe căi mai simple sau mai complicate, în intermediari ai ciclului acizilor tricarboxilici sau în compuși aflați în strinsă legătură cu acest ciclu: oxaloacetat,  $\alpha$ -cetoglutarat, succinil ~ CoA, fumarat, piruvat, acetoacetil ~ CoA, acetil ~ CoA. În cazul unora dintre aminoacizi există căi specifice de trecere spre doi dintre compușii menționați: triptofanul la acetil ~ CoA și acetoacetil ~ CoA, tirozina la fumarat și acetoacetil ~ CoA etc. (fig. IX.6).

Toate transformările aminoacizilor spre compușii din fig. IX.6, includ obligatoriu transaminări sau dezaminări. În cazul unora, simpla transaminare sau hidroliză și transaminare conduce la  $\alpha$ -cetoglutarat (acidul glutamic și glutamină), oxaloacetat (acidul aspartic și asparagina) sau piruvat (alanina).

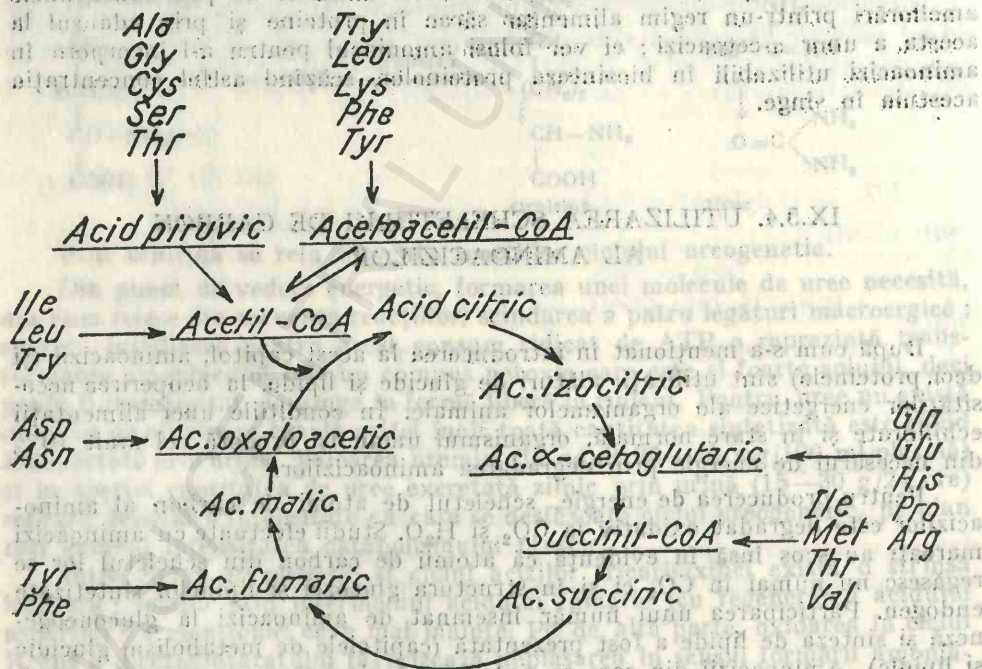
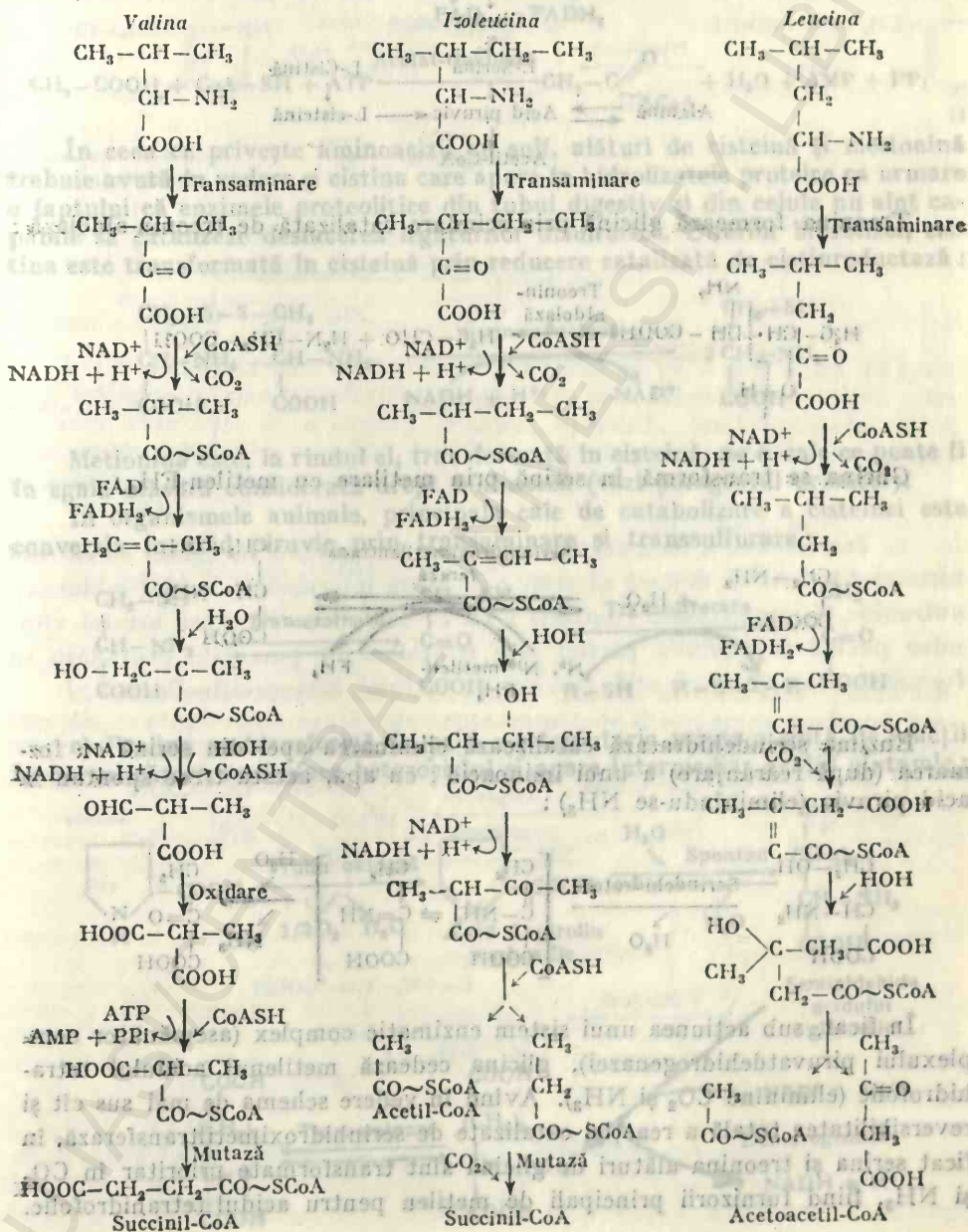


Fig. IX.6 — Schemă generală reprezentând conversia aminoacizilor în intermediari ai ciclului acizilor tricarboxilici (sau metaboliți corelați cu acesta) în vederea participării la gluconeogeneză, sinteză de lipide și degradare la  $\text{CO}_2$  și  $\text{H}_2\text{O}$ .

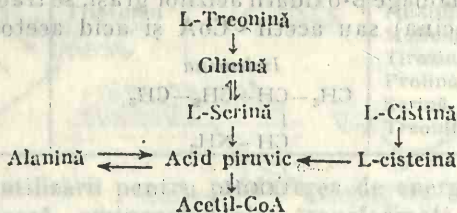


Transformările celorlalți aminoacizi sînt mai complexe. Se dau cîteva dintre acestea :

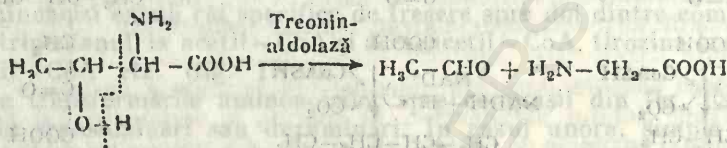
a. Aminoacizii alifatici cu catenă ramificată (valina, leucina și izoleucina) se degradează în faza inițială prin reacții comune, respectiv transaminare și decarboxilări oxidative în urma cărora se obțin derivați acil ~ CoA ; aceștia, prin reacții analoage  $\beta$ -oxidării acizilor grași, se transformă în succinil ~ CoA (valina și izoleucina) sau acetil ~ CoA și acid acetoacetic (leucina) :



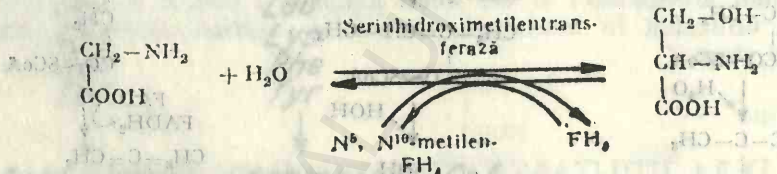
b. Catabolismul hidroxi aminoacizilor, tio aminoacizilor și glicocolului; din scheletul atomilor de carbon a tuturor acestor aminoacizi se formează acid piruvic (și în continuare acetyl-CoA). Succesiunea transformărilor este redată prin următoarea schemă generală (în care s-a introdus și alanina care formează acid piruvic prin simplă transaminare):



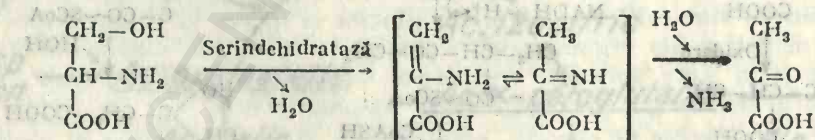
Treonina formează glicină prin scindare catalizată de treonin-aldolază:



Glicina se transformă în serină prin metilare cu metilen-FH<sub>4</sub>:



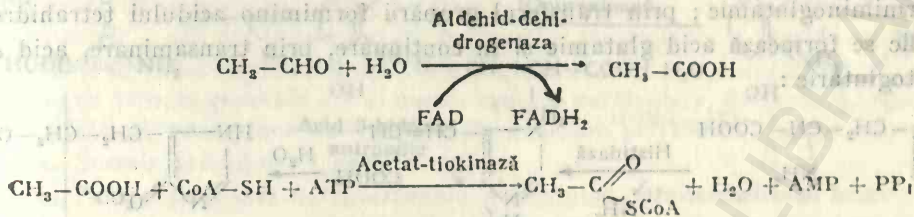
Enzima serindehidratază catalizează eliminarea apei din serină cu formarea (după rearanjare) a unui iminoacid; cu apa, acesta trece spontan în acid piruvic (eliminându-se NH<sub>3</sub>):



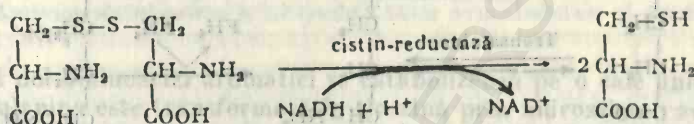
În ficat, sub acțiunea unui sistem enzimatic complex (asemănător complexului piruvatdehidrogenazei), glicina cedează metilenul acidului tetrahidrofolic (eliminând CO<sub>2</sub> și NH<sub>3</sub>). Având în vedere schema de mai sus cît și reversibilitatea totală a reacției catalizate de serinhidroximetiltransferază, în ficat serina și treonina alături de glicină sînt transformate prioritar în CO<sub>2</sub> și NH<sub>3</sub>, fiind furnizorii principali de metilen pentru acidul tetrahidrofolic.



Se menționează că acetaldehida, formată alături de glicină la scindarea treoninei sub acțiunea treoninaldolazei, prin oxidare la acid acetic și reacția acestuia cu CoA conduce la acetyl-CoA:

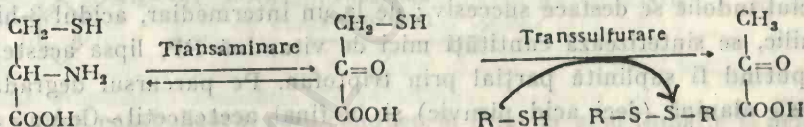


În ceea ce privește aminoacizii cu sulf, alături de cisteină și metionină trebuie avută în vedere și cistina care apare în hidrolizatele proteice ca urmare a faptului că enzimele proteolitice din tubul digestiv și din celule nu sînt capabile să catalizeze desfacerea legăturilor disulfurice. Ulterior hidrolizei, cistina este transformată în cisteină prin reducere catalizată de cistinreductază:

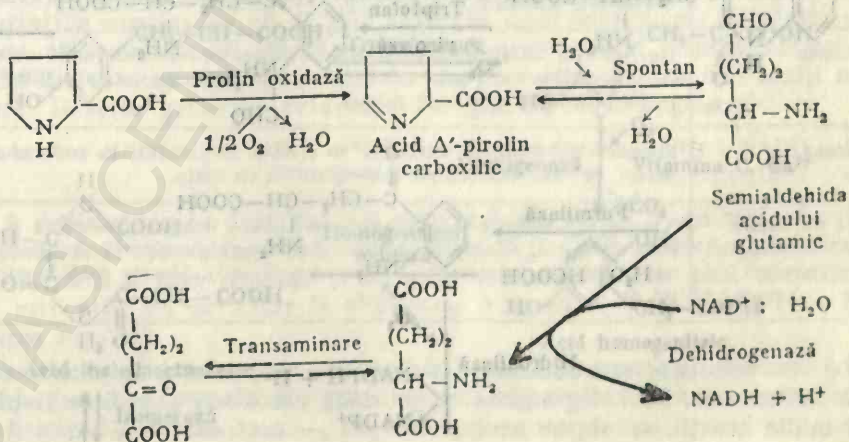


Metionina este, la rîndul ei, transformată în cisteină, pe o cale ce poate fi în egală măsură considerată drept biosinteză (vezi paragraful următor).

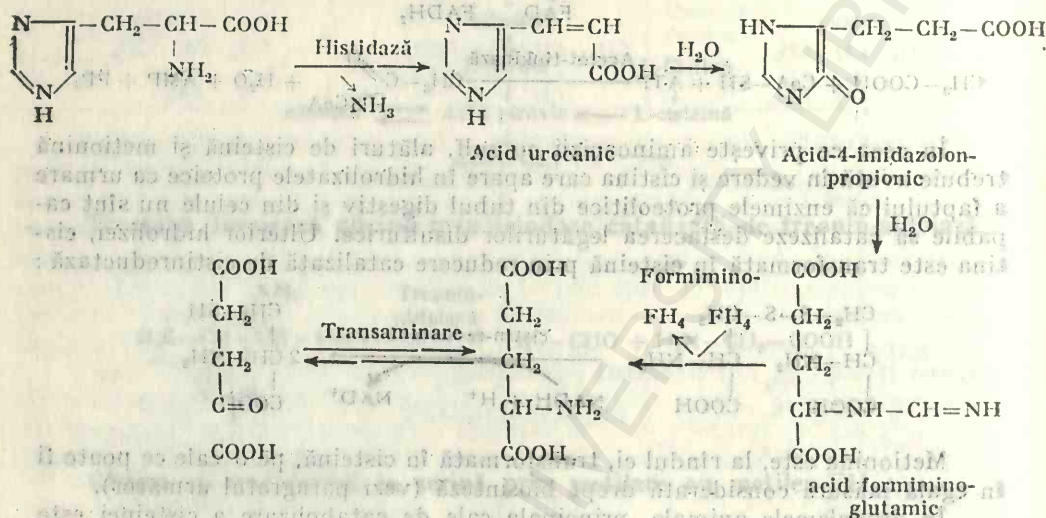
În organismele animale, principala cale de catabolizare a cisteinei este conversia în acid piruvic prin transaminare și transsulfurare:



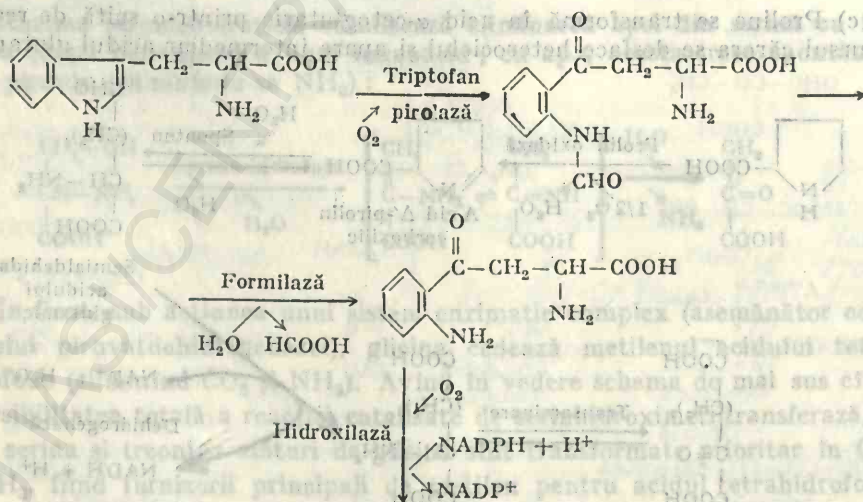
c) Prolina se transformă în acid  $\alpha$ -cetoglutaric printr-o suită de reacții în cursul cărora se desface heterociclul și apare intermediar acidul glutamic:



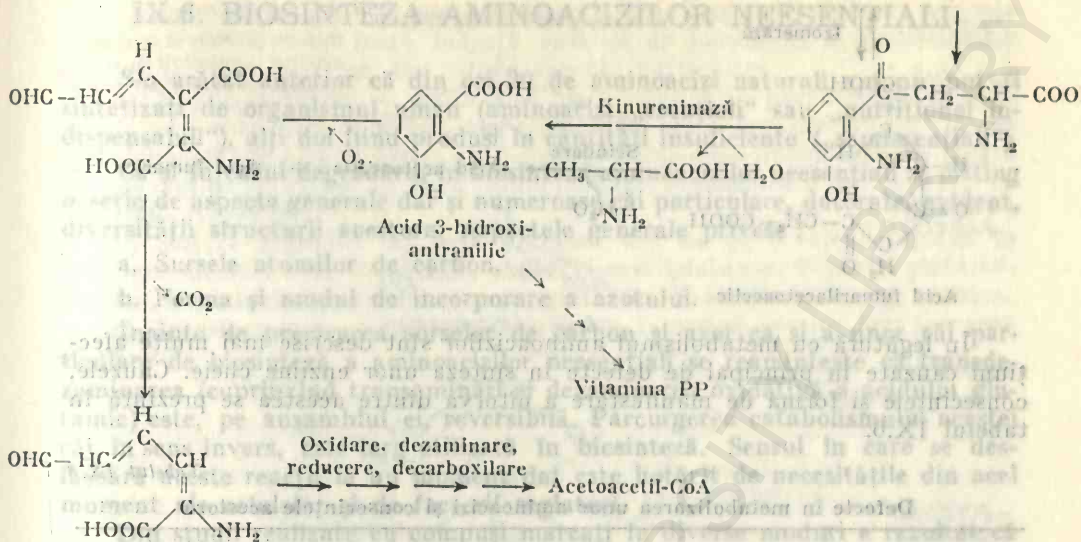
d. Histidina elimină amoniac în prezența unei enzime specifice numită histidază (histidinamonioliază); prin hidratarea produsului obținut (acidul urocanic) se formează un heterociclu care poate fi desfăcut conducând la acid formiminoglutamic; prin transferul grupării formimino acidului tetrahidrofolic se formează acid glutamic și în continuare, prin transaminare, acid  $\alpha$ -cetoglutaric :



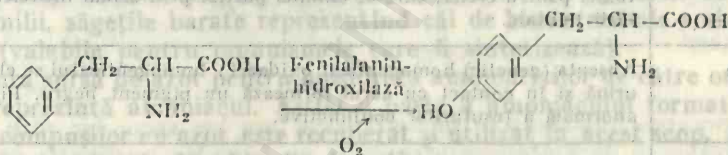
e. Triptofanul se degradează pe o cale complicată în cursul căreia heterociclu indolic se desface succesiv; de la un intermediar, acidul 3-hidroxi-antranilic, se sintetizează cantități mici de vitamină PP, lipsa acestei vitamine putând fi suplinită parțial prin triptofan. Pe parcursul degradării se formează alanina (deci acid piruvic) și în final acetoacetyl ~ CoA :



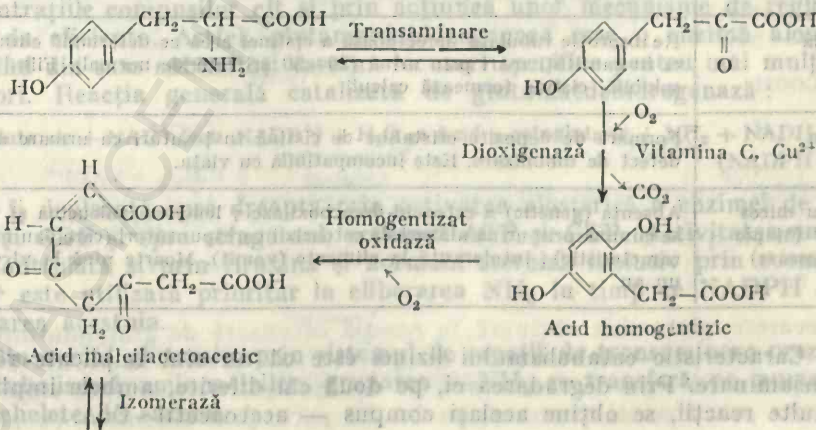


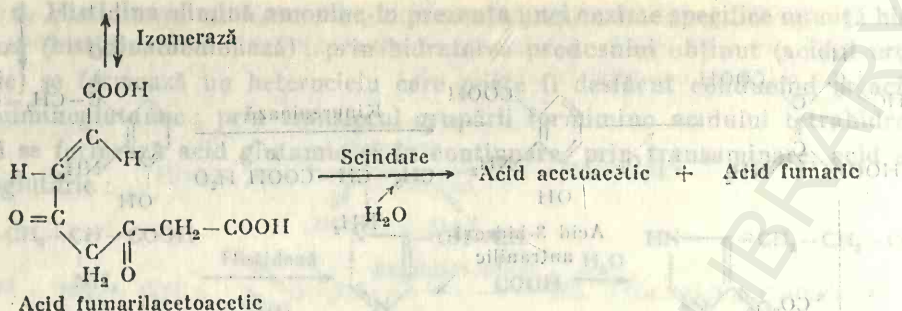


f. Cei doi aminoacizi aromatici se catabolizează pe o cale unică. În acest scop fenilalanina este transformată în tirozină prin hidroxilare; această reacție este catalizată de o enzimă hepatică specifică, fenilalaninhidroxilaza, care, pe lângă NADPH, necesită, în calitate de cofactor, biopterină, un compus asemănător acizilor tetrahidrofolic:



În cursul catabolizării, care conduce în final la acid fumaric și acid acetoacetic, o etapă importantă este reprezentată de deschiderea nucleului benzenic sub acțiunea homogentizat oxidazei; la aceste reacții complexe participă vitamina C, glutatiunul precum și ioni de  $Fe^{2+}$  și  $Cu^{2+}$ :





În legătură cu metabolismul aminoacizilor sînt descrise mai multe afecțiuni cauzate în principal de defecte în sinteza unor enzime cheie. Cauzele, consecințele și forma de manifestare a cîtorva dintre acestea se prezintă în tabelul IX.6.

Tabelul IX.6

**Defecte în metabolizarea unor aminoacizi și consecințele acestora**

Numele	Cauza și forma de manifestare
1	2
Fenilcetonuria	Absența (genetic) fenilalanin-hidroxilazei; neputîndu-se transforma în tirozină, fenilalanina se transformă în acizi fenilpiruvici și fenil-lactici, toxici pentru creier, care se elimină parțial prin urină. Întîrzierea dezvoltării mintale.
Alcaptonuria	Absența (genetic) homogentizat oxidazei; homogentizatul se elimină prin urină și în contact cu aerul formează un pigment negru. Pigmentarea anormală a țesuturilor conjunctive.
Albinismul	Lipsa tirozinazei, enzima ce inițiază oxidarea tirozinei pentru formarea de pigmenți melaninici. Părul și pielea nu sînt colorate.
Histidinemia	Lipsa histidin-amonio liazei (histidaza); histidina se elimină parțial prin urină, parțial se transformă în acid imidazol-piruvic. Cauzează întîrzierea dezvoltării generale și a vorbirii.
Cistinuria	Reabsorbție tubulară defectuoasă a cistinei ceea ce determină eliminarea ei în cantități mari prin urină (20—30 ori față de normal). Fiind puțin solubilă, cistina formează calculi.
Cistinoza	Formare de depozite cristaline de cistină în țesuturi ca urmare a unui defect de mobilizare. Este incompatibilă cu viața.
Urina cu miros de arșar (Maple syrup disease)	Absența (genetic) α-cetoacid-decarboxilazei; leucina, izoleucina și valina se elimină prin urină alături de cetoacizii corespunzători (care dau mirosul caracteristic); intoleranță la alimente (vomit). Moarte pînă la vîrsta de un an.

g. Caracteristic catabolismului lizinei este că nu sînt implicate reacții de transaminare. Prin degradarea ei, pe două căi diferite, ambele implicînd mai multe reacții, se obține același compus — acetoacetyl~CoA.



## IX.6. BIOSINTEZA AMINOACIZILOR NEESENȚIALI

S-a arătat anterior că din cei 20 de aminoacizi naturali opt nu pot fi sintetizați de organismul uman (aminoacizi „esențiali” sau „nutrițional indispensabili”), alți doi fiind produși în cantități insuficiente („semiesențiali”).

Ca și în cazul degradării, în biosinteza aminoacizilor neesențiali se disting o serie de aspecte generale dar și numeroase căi particulare, datorate, evident, diversității structurii acestora. Aspectele generale privesc :

a. Sursele atomilor de carbon.

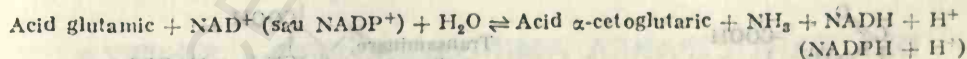
b. Forma și modul de incorporare a azotului.

Înainte de precizarea surselor de carbon și azot ca și a unor căi particulare de biosinteză a aminoacizilor neesențiali se reamintește că transdezaminarea (cuprinzând transaminări și dezaminarea oxidativă a acidului glutamic) este, pe ansamblul ei, reversibilă. Parcurgerea catabolismului acestei căi, în sens invers, este larg utilizată în biosinteză. Sensul în care se desfășoară aceste reacții la un moment dat este hotărât de necesitățile din acel moment ale celulelor și de factorii reglatori.

Din studii realizate cu compuși marcați în diverse moduri a rezultat că scheletele de carbon ale aminoacizilor neesențiali provin dintr-o serie de intermediari, în principal ai metabolismului glucidic : acidul  $\alpha$ -cetoglutaric și acidul oxaloacetic (ciclul acizilor tricarboxilici), acidul fosfoenolpiruvic, acidul piruvic și acidul 3-fosfoglicerice (glicoliză), ribozo-5-fosfat și eritrozo-4-fosfat (calea pentozofosfaților). De la fiecare din acești compuși se formează de regulă mai mulți aminoacizi care constituie o familie. În fig. IX.7 se prezintă aceste familii, săgețile barate reprezentând căi de biosinteză ale aminoacizilor esențiali (valabile pentru organismele care îi sintetizează).

Singura sursă de azot pentru biosinteza aminoacizilor de către organismul uman o reprezintă amoniacul. Astfel o parte a amoniacului format prin degradarea compușilor cu azot este recuperat și utilizat în acest scop. La acesta se adaugă amoniacul absorbit din intestin.

Calea cea mai însemnată de formare din amoniac a grupărilor amino ale aminoacizilor se realizează prin intermediul reacțiilor catalizate de glutamatdehidrogenază și aminotransferaze. Deplasarea echilibrului reacțiilor catalizate de aceste enzime în sens catabolic sau anabolic se face atît prin concentrațiile compușilor cît și prin acțiunea unor mecanisme de reglaj extrem de eficiente. Astfel, glutamatdehidrogenaza este o enzimă alosterică constind din șase subunități care au locusuri specifice pentru mai mulți modulatori. Reacția generală catalizată de glutamatdehidrogenază :



poate fi deplasată spre dreapta prin activarea alosterică a enzimei de către ADP și GDP și spre stînga sub acțiunea ATP și GTP. Activitatea enzimei este controlată și prin tiroxină și hormoni steroizi, inclusiv prin coenzime :  $\text{NAD}^+$  este utilizată prioritar la eliberarea  $\text{NH}_3$  în timp ce  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  la fixarea acestuia.

Din acidul glutamic, prin sistemul de reacții de transaminare prezentat la catabolismul aminoacizilor, gruparea  $-\text{NH}_2$  se transferă pe numeroase alte schelete de carbon.

**Familia:**

- **acidului glutamic**

- **acidului aspartic**

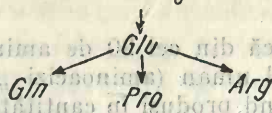
- **serinei**

- **acidului piruvic**

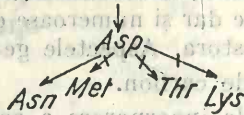
- **aminoacizilor aromatici**

- **histidinel**

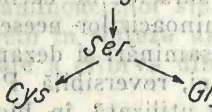
Acid  $\alpha$ -cetoglutamic



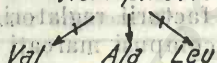
Acid oxaloacetic



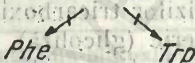
Acid 3-P-gliceric



Acid piruvic



PEP + Eritrozo-4-P

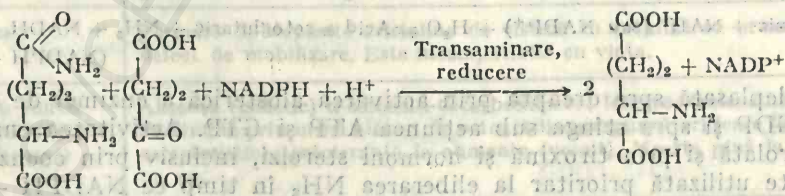
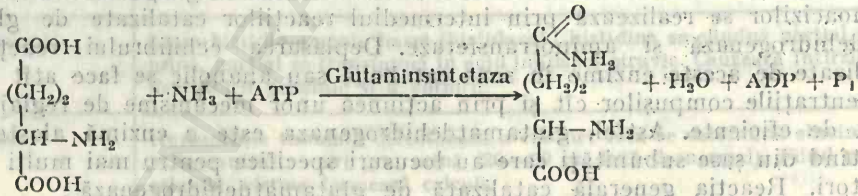


Ribozo-5-P



Fig. IX.12. Schemă generală de biosinteză a aminoacizilor pornind de la intermediarii ai metabolismului glucidic.

Incorporarea amoniacului în aminoacizi are loc secundar, prin reacțiile cuplate catalizate de glutaminsintetază și un complex enzimatic cu însușiri de transaminază și reductază:



Deoarece glutamina obținută în reacția catalizată de glutaminsintetază este utilizată și pentru sinteza altor compuși cu azot (de ex. nucleotidele purinice și pirimidinice), activitatea acestei enzime este de asemenea reglată pe de o parte prin efectori alosterici, pe de altă parte prin modificări covalente.

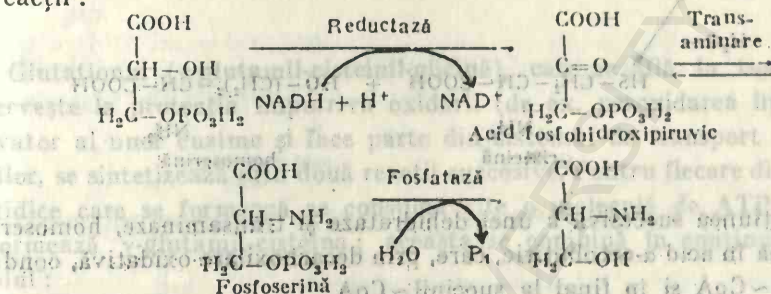


În completarea acestor aspecte generale, prin intermediul cărora se poate interpreta în cea mai mare măsură schema de biosinteză a aminoacizilor neesențiali (fig. IX.7) se dau câteva aspecte particulare.

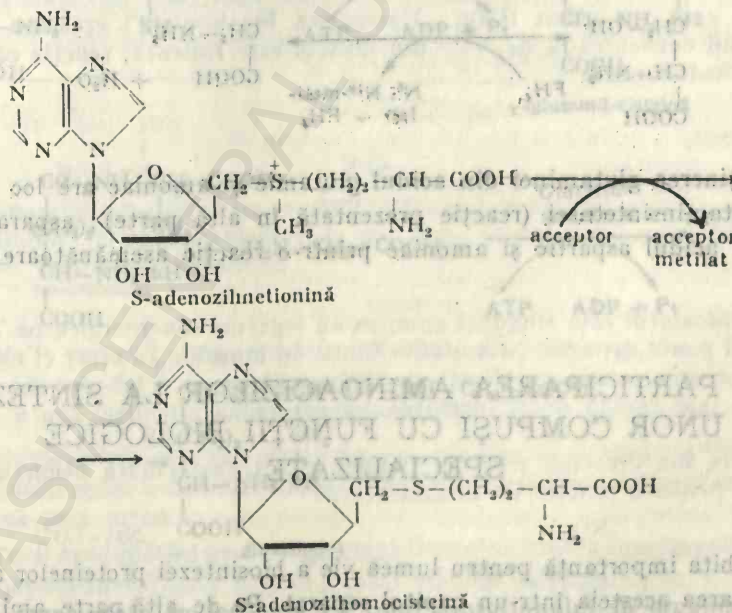
a) Acidul glutamic se transformă în prolină prin parcurgerea în sens invers, cu foarte mici diferențe, a reacțiilor din calea degradativă: formarea semialdehidei acidului glutamic are loc în prezența unei dehidrogenaze-kinaze (cu consum de ATP) iar în locul prolin-oxidazei acționează o hidrogenază cu coenzimă NADPH.

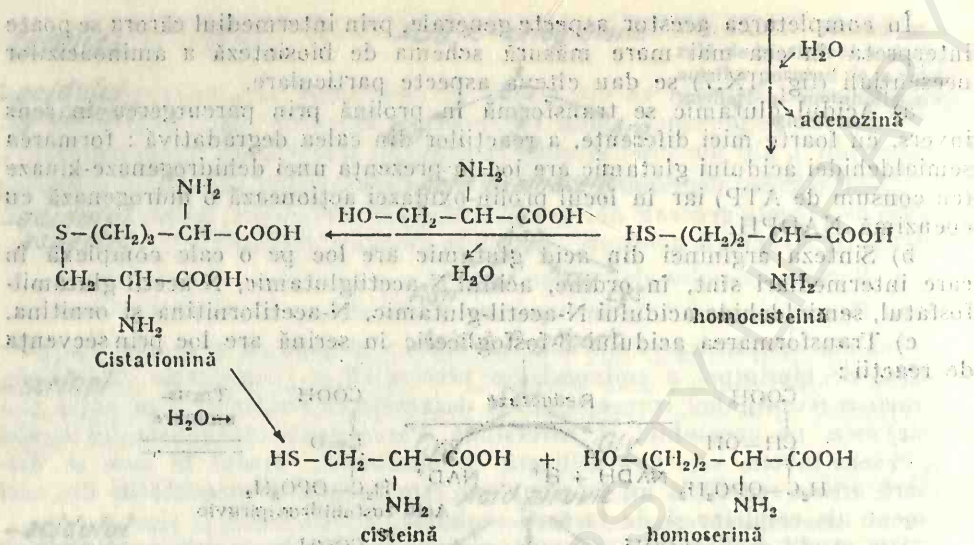
b) Sinteza argininei din acid glutamic are loc pe o cale complexă în care intermediari sint, în ordine, acidul N-acetilglutamic, N-acetil glutamil-fosfatul, semialdehida acidului N-acetil-glutamic, N-acetilornitina și ornitina.

c) Transformarea acidului 3-fosfoglicerice în serină are loc prin secvența de reacții:



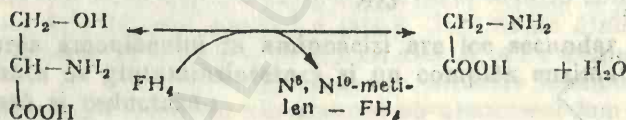
d) Serina participă la sinteza cisteinei în cadrul unui proces complex corelat cu transferul de radicali metil de către S-adenozil-metionină. Cedând metilul unor acceptori, S-adenozil-metionina se transformă în S-adenozil-homocisteină, care, în reacție cu serina, formează cisteina:





Prin acțiunea succesivă a unei dehidrataze și transaminaze, homoserina se transformă în acid  $\alpha$ -cetobutiric, care, prin decarboxilare oxidativă, conduce la propionil~CoA și în final la succinil~CoA.

e) Prin cedarea fragmentului de un carbon acidului tetrahidrofolic, serina se transformă în glicocol, reacția aceasta fiind reversibilă (vezi importanța acestei transformări în Cap. „Vitamine și coenzime”):



f) Obținerea glutaminei din acidul glutamic și amoniac are loc sub acțiunea glutaminsintetazei (reacție prezentată în altă parte); asparagina se obține din acidul aspartic și amoniac printr-o reacție asemănătoare.

## IX.7. PARTICIPAREA AMINOACIZILOR LA SINTEZA UNOR COMPUȘI CU FUNCȚII BIOLOGICE SPECIALIZATE

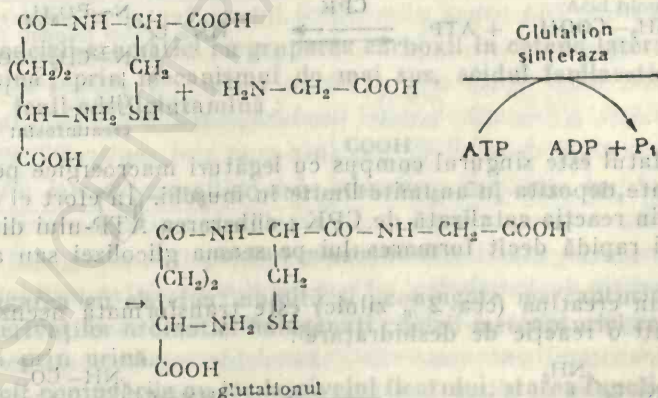
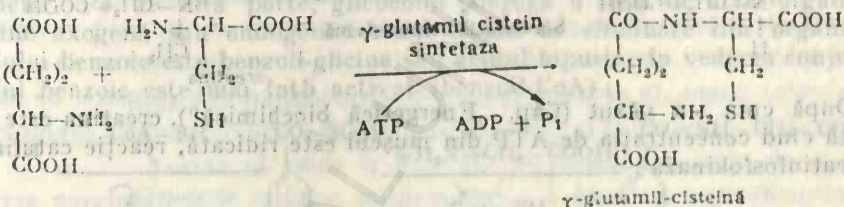
Deosebita importanță pentru lumea vie a biosintezei proteinelor a determinat tratarea acestora într-un capitol separat. Pe de altă parte, aminoacizii participă la sinteza unui număr foarte mare de compuși biologici cu funcții



specializate. În această categorie se încadrează sinteza aminelor biogene, catecolaminelor, hormonilor tiroidieni, nucleotidelor purinice și pirimidinice și a hemului, prezentate de asemenea în alte capitole. În continuare se prezintă, selectiv, alte sinteze la care participă unii aminoacizi: biosinteza de oligopeptide (exemplificată prin glutatión), formarea compuşilor de conjugare și metabolismul creatinei.

### IX.7.1. BIOSINTEZA GLUTATIONULUI

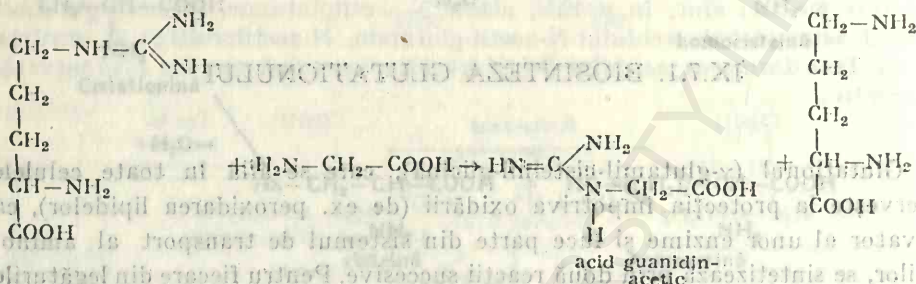
Glutathionul ( $\gamma$ -glutamil-cisteinil-glicină), care se află în toate celulele și servește la protecția împotriva oxidării (de ex. peroxidarea lipidelor), ca activator al unor enzime și face parte din sistemul de transport al aminoacizilor, se sintetizează prin două reacții succesive. Pentru fiecare din legăturile peptidice care se formează se consumă câte o moleculă de ATP. Mai întâi se formează  $\gamma$ -glutamil-cisteina; aceasta se combină în continuare cu glicocolul:



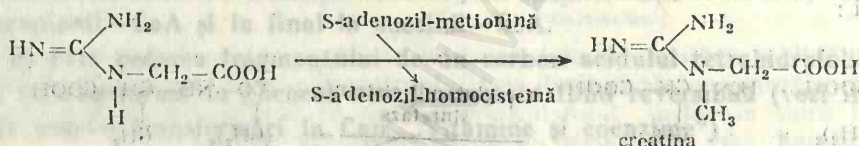
Cele menționate în legătură cu rolul glutathionului în organism vor fi dezvoltate și completate în capitolele următoare.

## IX.7.2. METABOLISMUL CREATINEI

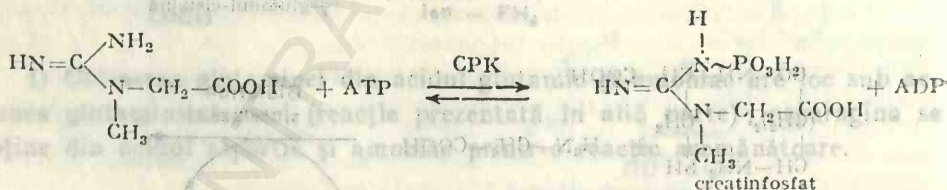
Glicina și arginina sînt sursele de carbon și de azot ale creatinei (acidul N-metil-guanidin, acetic). Prima etapă în biosinteză, care are loc numai în mușchi, este reprezentată de transferul grupării amidinice de pe arginină pe glicină cu formarea acidului guanidin-acetic și ornitină, reacție catalizată de glicin-amidinotransferază :



Acidul guanidin acetic este metilat de către S-adenozilmetionină, formîndu-se creatina :

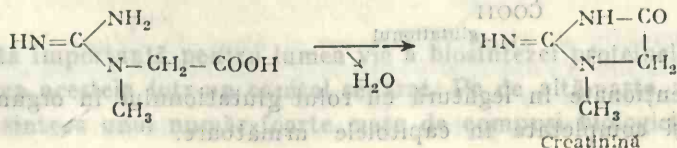


După cum s-a văzut (Cap. „Energetică biochimică“), creatina este fosforilată cînd concentrația de ATP din mușchi este ridicată, reacție catalizată de creatinfosfokinază :



Creatinfosfatul este singurul compus cu legături macroergice pe care organismul îl poate depozita în anumite limite în mușchi. În efort el eliberează ATP-ul, tot prin reacția catalizată de CPK ; eliberarea ATP-ului din creatinfosfat este mai rapidă decît formarea lui pe seama glicolizei sau a lanțului respirator.

O parte din creatină (cca 2% zilnic) este transformată neenzimatic în creatinină printr-o reacție de deshidratare :

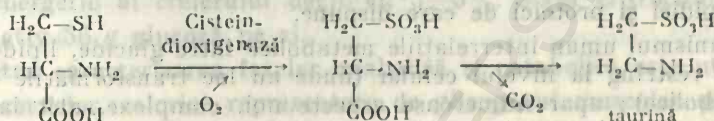




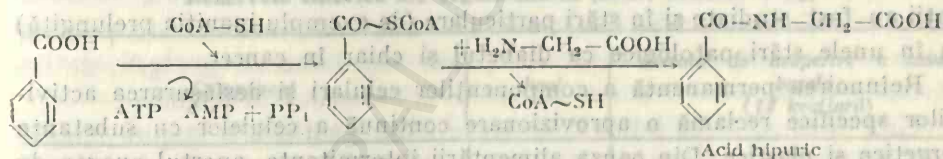
Creatinina se elimină prin urină. Fiind produsă aproape în totalitate de mușchi, cantitatea de creatinină formată este proporțională cu masa musculară; scăderea eliminării reflectă deci stări de distrofie musculară. Pe de altă parte, clearance-ul de creatinină este o metodă simplă, extrem de utilă în investigarea funcției renale (pentru alte aspecte privind metabolismul creatinei vezi „Metabolismul țesutului muscular” și „Rinichiul și urina”).

### IX.7.3. COMPUȘI „CONJUGAȚI” AI AMINOACIZILOR

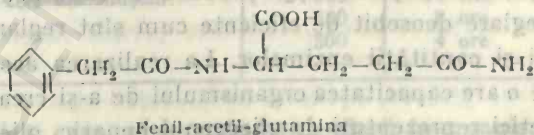
Dreptă importantă prezintă compușii de conjugare ai glicocolului, glutaminei, cisteinei precum și ai taurinei, aceasta din urmă rezultând din cisteină prin decarboxilare și oxidare:



Glicocolul și taurina conjugă acizii biliari, care, după cum s-a arătat (vezi „Metabolismul lipidelor”), sînt esențiali pentru digestia și absorbția lipidelor. Pe de altă parte, glicocolul conjugă o serie de acizi organici de origine exogenă sau endogenă. Astfel forma de eliminare din organism a acidului benzoic este benzoil-glicina sau acidul hipuric; în vederea conjugării, acidul benzoic este mai întîi activat (benzoil-CoA):



Aminoacizii aromatici cu gruparea carboxil în catena laterală se conjugă cu glutamina; prin mecanismul de mai sus, acidul fenilacetic formează cu glutamina fenil-acetilglutamină:



Conjugarea cu cisteina, numită și „conjugare mercapturică” este caracteristică derivaților aromatici halogenați; acizii mercapturici care se formează se elimină prin urină.

Întrucît conjugările au loc la nivelul ficatului, starea funcțională a acestui organ poate fi investigată și prin capacitatea de conjugare; în acest scop se dozează acidul hipuric în urină după patru ore de la ingerarea unei doze test de benzoat de sodiu.

## IX.8. INTERRELAȚII ÎNTRE METABOLISMUL GLUCIDELOR, LIPIDELOR ȘI PROTEINELOR

Gluconeogeneza din aminoacizi și din glicerol, biosinteza acizilor grași pe seama excesului glucidic, conversia biunivocă aminoacizi — intermediari ai ciclului acizilor tricarboxilici, sînt cîteva dintre căile metabolice care operează în sensul transformării unor compuși aparținînd uneia din cele trei clase (glucide, lipide, proteine) în compuși aparținînd celorlalte două clase. Pe de altă parte, numeroase căi metabolice specifice uneia dintre cele trei clase sînt corelate, prin diverși intermediari, cu căi metabolice specifice celorlalte clase (cazul glicolizei, corelată prin DHAP cu metabolismul lipidic și prin acidul piruvic cu metabolismul proteic). Numai prin astfel de corelații se asigură, la nivelul oricărui organism viu, posibilitatea adaptării la variațiile foarte mari și, uneori foarte rapide, ale calității și cantității compușilor glucidici, lipidici și proteici de care dispune.

În organismul uman interrelațiile metabolice între glucide, lipide și proteine nu se restrîng la nivelul celular (unde au loc transformările specifice căilor metabolice); apar numeroase aspecte noi, complexe, atît la nivelul diferitelor țesuturi și organe cît și la nivelul organismului în ansamblu. Deoarece alte interrelații la nivel celular decît cele prezentate și interrelațiile la nivelul diverselor țesuturi și organe vor fi tratate în capitolele următoare (de biochimie a țesuturilor și organelor), în continuare se prezintă o serie de aspecte integrative ale metabolismului celor trei clase de compuși la nivelul organismului uman, în condiții fiziologice. Se menționează că astfel de interrelații au fost studiate și în stări particulare (de exemplu inaniția prelungită) sau în unele stări patologice ca diabetul și chiar în cancer.

Reînnoirea permanentă a componenților celulari și desfășurarea activităților specifice reclamă o aprovizionare continuă a celulelor cu substanțe energetice și plastice. Din cauza alimentării intermitente, aportul exogen de substrate este însă discontinuu; pe de altă parte, în funcție de natura alimentelor ingerate, acest aport este și foarte variat. Nivelarea, sub aspectul calității și cantității, a deviațiilor astfel produse se realizează prin intervenția unor sisteme de reglare deosebit de eficiente cum sînt reglarea hormonală și reglarea activității și cantității enzimelor. La realizarea acestei nivelări importanță deosebită o are capacitatea organismului de a-și crea rezerve de compuși potent energetici reprezentați de glicogenul hepatic, glicogenul muscular și trigliceride, funcția de distribuitor a ficatului și vehicularea prin intermediul sîngelui a unui mare număr de compuși glucidici, lipidici și proteici.

Chiar în cazul unui consum energetic bazal (de întreținere), în condițiile alimentației intermitente, glicogenul hepatic variază între limita maximă și cea minimă a cantității sale; conținutul trigliceridelor de depozit fluctuează de asemenea dar este mai puțin sesizabil din cauza rezervelor mari pe care organismul le deține. Au loc de asemenea variații ale concentrației glucozei,



aminoacizilor și a mai multor lipide la nivelul singelui. În condițiile unui efort intens fluctuațiile acestea sînt mai mari și, în plus, apar fluctuații ale glicogenului muscular și ale proteinelor (în special cele musculare).

Rezultă deci că datorită alternanței perioadelor de alimentare cu postul și în dependență de consumul de energie, organismul uman se poate afla într-o multitudine de stări (faze) care se diferențiază prin natura și, în special, prin intensitatea proceselor metabolice. La extreme se află faza anabolică și faza catabolică.

Dacă la trecerea de la catabolism la anabolism și viceversa au loc perturbații metabolice semnificative în ficat, mușchii scheletici și țesutul adipos, la nivelul altor țesuturi (celule) aceste perturbații sînt minime. De exemplu creierul și hematiile au un consum energetic constant. Consumul de glucoză în creier este de 120 g/zi, ceea ce reprezintă aproximativ 25% din consumul caloric al unui adult în repaus. Nevoia de energie a creierului este invariabilă, nu depinde de intensitatea activității nervoase; somnul nu scade consumul energetic al creierului decît cu 3—5%. Masa eritocitară consumă aproximativ 36 g glucoză pe zi.

Pentru caracterizarea fazelor anabolică și catabolică este utilă cunoașterea rezervelor calorice reprezentate de glicogenul muscular și hepatic, a trigliceridelor din țesutul adipos, a masei proteinelor musculare precum și celor reprezentate de glucoza, acizii grași liberi și trigliceridele plasmatice; acestea se dau în tabelul IX.7.

Tabelul IX.7

**Rezervele calorice ale organismului (adult normal 70 kg)**

Component	Kcal	Durata de acoperire a nevoilor bazale (12 kcal/oră)
Glucoza din lichidul extracelular	80	1 oră
Acizi grași liberi plasmatici	3	2,5 minute
Trigliceride plasmatice	30	25 minute
Trigliceride din țesutul adipos	141 000	81 zile
Proteine, în special cele din mușchi	24 000	14 zile
Glicogen muscular	600	8 ore
Glicogen hepatic	300	4 ore

Faza anabolică, care corespunde pătrunderii în organism a produselor de digestie a alimentelor, se caracterizează prin creșterea concentrației plasmatice a glucozei, aminoacizilor și trigliceridelor (sub formă de chilomicroni și lipoproteine cu densitate foarte mică). De exemplu glicemia atinge în această fază valori de 120—130 mg/100 ml plasmă (uneori chiar mai mari). Hiper-glicemia și hormonii eliberați de tractul gastro-intestinal declanșează secreția de insulină (vezi capitolul „Hormoni”); ca urmare este favorizată captarea și utilizarea intracelulară a glucozei în țesuturile insulino-sensibile. Prin co-

mutarea lipoproteinlipazei din țesutul adipos de la forma inactivă la una cu activitate catalitică mai mare, se asigură și îndepărtarea din circulație a trigliceridelor.

În faza anabolică ficatul asigură : a) fosforilarea unor cantități crescute de glucoză, acțiunea catalitică a hexokinazei fiind completată de acțiunea glucokinazei. Glucozo-6-fosfatul obținut prin fosforilare crește intensitatea tuturor căilor metabolice pe care le inițiază : arderea la  $\text{CO}_2$  și  $\text{H}_2\text{O}$ , refacerea depozitului de glicogen, conversia la trigliceride care vor fi expediate (sub formă de lipoproteine cu densitate foarte mică) spre țesutul adipos și alte țesuturi extrahepatice ; b) conversia unei părți din glucoză în aminoacizi, dacă rația alimentară cuprinde proteine puține sau de calitate inferioară ; c) absorbția unor cantități crescute de aminoacizi și resinteza proteinelor dislocate în faza catabolică.

Mușchii scheletici, insulino-sensibili, captează cu ușurință glucoza și aminoacizii din lichidul extracelular. În această fază se reface rezerva de glicogen și se resintetizează proteinele tisulare. Trigliceridele circulante din chilomicroni și lipoproteinele cu densitate foarte mică furnizează mușchilor acizi grași care sînt depozitați ca trigliceride tisulare.

În faza anabolică metabolismul țesutului adipos este deplasat spre lipogeneză. Capacitatea sa de depozitare este nelimitată, astfel încît substratele energetice — glucoza și acizii grași — care nu au putut fi păstrate în alte forme, sînt depozitate în țesutul adipos ca trigliceride. Insulinemia crescută facilitează pătrunderea intracelulară a glucozei care furnizează glicerol-fosfat iar lipoproteinlipaza activă permite hidroliza trigliceridelor circulante și utilizarea acizilor grași.

În sinteză, faza anabolică a metabolismului este caracterizată prin depozitarea excesului de substanțe energogene sub formă de glicogen, de trigliceride și de proteine. Insulina este factorul hormonal predominant.

Faza catabolică. În intervalele dintre mese, pentru a-și asigura homeostazia substratelor energetice în lichidele extracelulare, organismul face apel la rezervele sale calorice. Efectuarea de exerciții fizice sau răspunsul adaptativ la diverși factori agresivi crește consumul caloric cu mult peste nivelul bazal. În faza catabolică sînt puse în joc mecanisme reglatoare complexe, atât metabolice cît și neuro-hormonale, care permit mobilizarea gradată a rezervelor, utilizarea preferențială a unui substrat în locul altuia ce trebuie cruțat. Rezervele de glucide, lipide și de proteine sînt arse în proporții și cu viteze diferite după durată și intensitatea solicitării organismului.

Cerința majoră a fazei catabolice este asigurarea homeostaziei glicemice. Un anumit nivel al glicemiei este indispensabil pentru funcționarea sistemului nervos central și al hematiilor, țesuturi strict dependente de glucoza sanguină. O altă cerință este aprovizionarea tuturor celorlalte țesuturi cu substrat pentru îndeplinirea activității lor specifice. Substratele energetice oferite acestor țesuturi sînt : glucoză, acizi grași, corpi cetonici, aminoacizi. Tendința spre hipoglicemie caracteristică acestei faze a metabolismului duce la scăderea



debitului insulenic și la o utilizare periferică redusă a glucozei. Glucagonul, catecolaminele și glucocorticoizii sînt principalii hormoni care coordonează reacțiile de mobilizare a rezervelor energetice.

Țesutul adipos ca depozit caloric principal, joacă un rol cheie în furnizarea de substrate energogene. În faza catabolică activitatea lipoproteinlipazei este redusă și țesutul adipos este inapt pentru a utiliza trigliceridele circulante din lipoproteinele cu densitate foarte mică (puse în circulație de ficat). Lipoliza este accelerată, pe de o parte prin deficit de glicerolfosfat (rezultat al hipoglicemiei și hipoinsulinemiei) și pe de altă parte, prin eliberarea de adrenalină și de glucagon care activează trigliceridlipaza. În aceste condiții țesutul adipos trimite în circulație acizi grași care sînt utilizați de țesuturi ca material energogen (fac excepție creierul și hematiile); glicerolul din circulație este captat de ficat devenind material pentru sinteza de glucoză.

În faza catabolică, hipoinsulinemică, mușchii scheletici captează cantități mici de glucoză din sînge. Nevoile lor energetice sînt satisfăcute într-o primă etapă prin dislocarea glicogenului, glucoza este arsă la dioxid de carbon și apă sau degradată anaerob la acid lactic. Acizii grași obținuți din trigliceridele tisulare, din trigliceridele plasmatică (ca lipoproteine cu densitate foarte mică) sau din fracțiunea acizi grași liberi plasmatici, sînt suportul energetic major al mușchilor scheletici în activitate. Corpii cetonici pe care ficatul îi pune în circulație în faza catabolică sînt și ei utilizați cu vizeză mare în mușchi. După epuizarea rezervelor de glicogen (hepatic și muscular) organismul recurge la proteinele musculare pentru a obține material gluconeogenetic. Glucocorticoizii determină dislocarea proteinelor și aminoacizii sînt convertiți la nivelul ficatului în glucoză. Aceasta este calea principală de menținere a homeostaziei glicemice în foame.

Funcția determinantă a ficatului în faza catabolică este producția de glucoză pentru a menține glicemia la un nivel compatibil cu supraviețuirea. Substratele gluconeogenetice sînt în primul rînd aminoacizii obținuți prin degradarea proteinelor proprii și a celor din mușchi. Glicerolul format în țesutul adipos prin lipoliză joacă un rol important ca material gluconeogenetic dacă se ține seama de intensitatea lipolizei în foame. Rolul acidului lactic pentru gluconeogeneză este semnificativ doar în perioadele incipiente ale postului sau ale exercițiilor fizice, cînd mușchii consumă rezerva de glicogen. Hematiile furnizează acid lactic într-un ritm constant și acesta poate fi reconvertit în glucoză prin gluconeogeneză hepatică.

În faza catabolică utilizarea hepatică a glucozei este limitată numai la unele reacții indispensabile, ca sinteza de acid oxaloacetic pentru inițierea ciclului acizilor tricarboxilici, sinteză de glicerol-fosfat pentru esterificarea surplusului de acizi grași care pătrund în ficat. În această fază ficatul captează însă o fracțiune importantă din acizii grași liberi plasmatici pe care îi utilizează pentru sinteză de corpi cetoniici sau reesterificare la trigliceride, compuși ce sînt eliberați apoi în circulație.

Un adult sănătos poate supraviețui fără hrană timp de 3—4 luni, făcând apel la rezervele sale calorice. În tabelul IX.8 se arată ritmul în care sînt

Tabelul IX.8

Pierderile de materiale energetice în post

Durata postului	Pierderi în kcal/zi		
	Glucide	Proteine	Lipide
8—10 ore	200	300	1 200
8 zile	0	200	1 400
40 zile	0	75	1 350

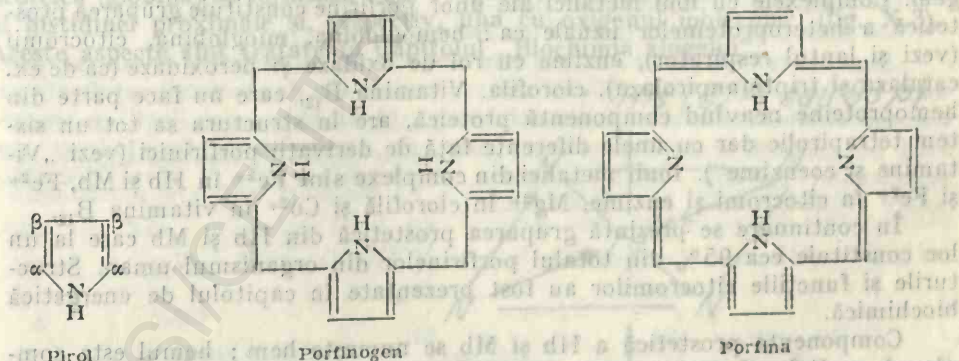
utilizate rezervele glucidice și lipidice cît și proteinele din țesuturi. După 8—10 ore de post, intervalul obișnuit dintre masa de seară și cea de dimineață, organismul a consumat din toate categoriile de componenți, diminuarea depozitului de glucide apărînd mai evidentă. În inaniția prelungită organismul obține glucoza pe seama celorlalți compuși, în special a proteinelor. Proteinele sînt utilizate continuu dar consumul se reduce de la 200—300 kcal/zi în primele zile de post la 75 kcal/zi după 40 de zile de foame. Trigliceridele sînt utilizate într-un ritm constant și la un nivel ridicat.



## Cap. X. METABOLISMUL HEMOPROTEINELOR

### X.1. ASPECTE CHIMICE

Grupările prostetice ale unui număr însemnat de heteroproteine constau din derivați substituiți și complexați cu ioni metalici ai unor heterocicluri diverse dintre care cel mai important este hemul. În structurile de bază ale hemului și derivaților acestuia patru molecule ale unui heterociclu simplu, pirolul, sînt legate între ele prin punți metilenice sau metinice astfel încît formează sisteme ciclice. Punțile metilenice sau metinice fac joncțiunea între atomii de carbon  $\alpha$  ai nucleelor pirolice. Compuși ciclici nesubstituiți sînt porfinogenul, dacă punțile sînt metilenice, și porfina, dacă punțile sînt metinice.



Porfinogenul și porfina nu apar în stare liberă în organismele vii, deoarece în cursul biosintezei se formează direct derivații substituiți ai acestora iar catabolizarea începe, la rîndul ei, cu deschiderea sistemului tetrapirociclic substituit.

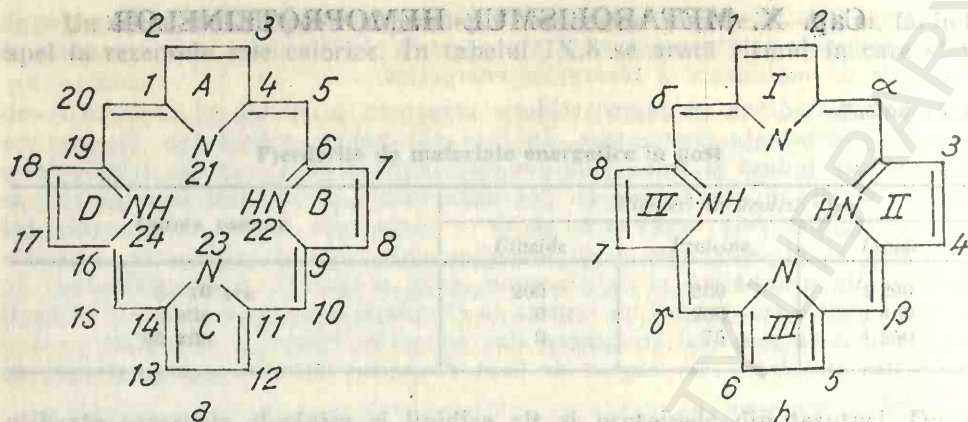


Fig. X.1 — Numerotarea porfinei: a) după o reglementare recentă; b) după H. Fischer, utilizată mai mult în prezent.

Numărul mare de compuși avînd la bază porfina și porfinogenul reclamă modalități precise de numerotare: curent este folosită numerotarea introdusă încă de H. Fischer în care cele 4 nuclee pirolice sînt notate de la I la IV, atomii de C din  $\beta$  ai acestor nuclee sînt numerotați cu cifrele 1...8 iar carbonii metinici (metilenici) cu  $\alpha$ ...8 (fig. X.1, b). Conform unei reglementări recente, care este încă puțin uzitată, nucleele pirolice se notează cu literele A...D iar atomii de C și de N ai ciclurilor și atomii de C ai punților metinice (metilenice) se notează în serie cu cifrele 1...24 începînd cu nucleul A; se redă această numerotare pentru porfină, ai cărei derivați substituți sînt grupări prostetice (derivații substituți ai porfinogenului fiind doar intermediari în biosinteza primilor (fig. X.1, a).

Derivații substituți cu diverși radicali în pozițiile 1...8 (numerotarea Fischer) ai porfinei se numesc porfirine iar cei ai porfinogenului — porfinogeni. Complexele cu ioni metalici ale unor porfirine constituie gruparea prostetică a heteroproteinelor uzuale ca: hemoglobina, mioglobina, citocromii (vezi și lanțul respirator), enzime cu rol de oxidaze și peroxidaze (ca de ex. catalaza și triptofanpirolaza), clorofila. Vitamina  $B_{12}$ , care nu face parte din hemoproteine neavînd componentă proteică, are în structura sa tot un sistem tetrapirolic dar cu unele diferențe față de derivații porfirinici (vezi „Vitamine și coenzime”). Ioni metalici din complexe sînt  $Fe^{2+}$  în Hb și Mb,  $Fe^{2+}$  și  $Fe^{3+}$  în citocromi și enzime,  $Mg^{2+}$  în clorofilă și  $Co^{2+}$  în vitamina  $B_{12}$ .

În continuare se prezintă gruparea prostetică din Hb și Mb care la un loc constituie cca 95% din totalul porfirinelor din organismul uman. Structurile și funcțiile citocromilor au fost prezentate în capitolul de energetică biochimică.

Componenta prostetică a Hb și Mb se numește hem; hemul este complexul cu  $Fe^{2+}$  al unei porfine, numită protoporfirină IX, în care în pozițiile  $\beta$  ale nucleelor pirolice se află următorii substituenți: patru radicali metil (pozițiile 1, 3, 5 și 8), doi radicali vinil (pozițiile 2 și 4) și două resturi de acid propionic (pozițiile 6 și 7). Structura completă a hemului este dată în fig. X.2 a, în timp ce în fig. X.2 b se redă un mod simplificat de reprezentare propus tot de Hans Fischer (unde M = metil, V = vinil,



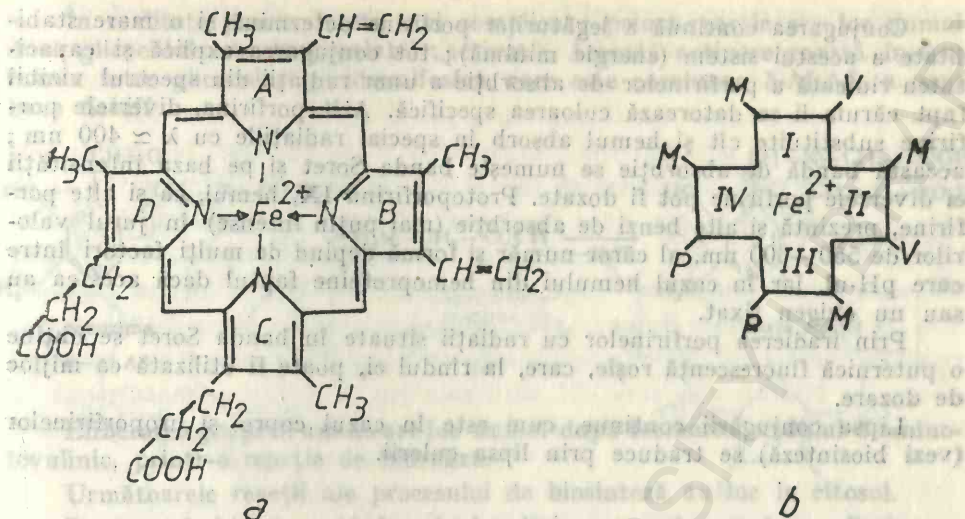


Fig. X.2 — Structura hemului (a) și o reprezentare simplificată (b).

P = rest de acid propionic); se observă că în reprezentarea simplificată apar numai pozițiile  $\beta$  ale celor 4 nuclee pirolice, cu substituții lor.

În protoporfirina IX (și în general în toate porfirinele) legăturile simple alternează cu legăturile duble pe întreg sistemul alcătuit din nuclee pirolice + punți metinice. Conjugarea continuă face posibilă existența unui număr mare de mezomeri, cel din fig. X.2 a fiind doar unul dintre ei. Pe de altă parte, conjugarea continuă determină planaritatea porfirinei; în cazul hemului, ionul de  $Fe^{2+}$ , situat în centrul acestui plan, se leagă prin două legături covalente cu atomii de azot ai nucleelor pirolice A și C și două legături coordinative cu ceilalți doi atomi de azot. Deoarece fierul poate fi pentacoordinat sau hexacoordinat, în cazul când hemul este inclus cu componenta proteică (globina) se formează încă o legătură coordinativă cu atomul de azot al histidinei proximale și, respectiv, una cu oxigenul molecular (fig. X.3). Aceste aspecte sint tratate în Capitolul „Biochimia singelui”.

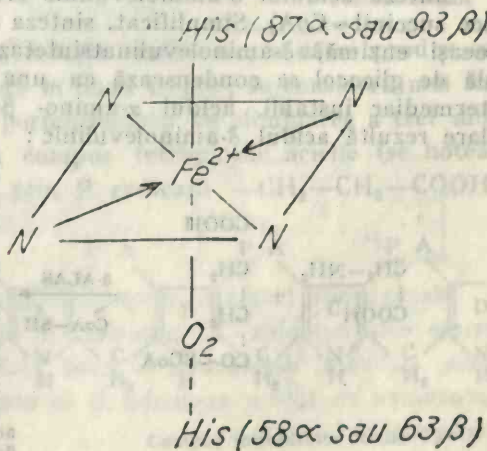


Fig. X.3 — Legăturile  $Fe^{2+}$  cu atomii de azot ai protoporfirinei IX, cu  $O_2$  și cu resturile de histidină din globine.

Conjugarea continuă a legăturilor porfirine determină și o mare stabilitate a acestui sistem (energie minimă); tot conjugarea explică și capacitatea ridicată a porfirinelor de absorbție a unor radiații din spectrul vizibil fapt căruia li se datorează culoarea specifică. Atît porfirina, diversele porfirine substituite cît și hemul absorb în special radiațiile cu  $\lambda \approx 400$  nm; această bandă de absorbție se numește banda Soret și pe baza intensității ei diversele porfirine pot fi dozate. Protoporfirina IX, hemul, ca și alte porfirine, prezintă și alte benzi de absorbție (mai puțin intense) în jurul valorilor de 550—600 nm, al căror număr și formă depind de mulți factori între care pH-ul, iar în cazul hemului din hemoproteine faptul dacă acestea au sau nu oxigen fixat.

Prin iradierea porfirinelor cu radiații situate în banda Soret se obține o puternică fluorescență roșie, care, la rîndul ei, poate fi utilizată ca mijloc de dozare.

Lipsa conjugării continue, cum este în cazul copro- și uroporfirinelor (vezi biosinteza) se traduce prin lipsa culorii.

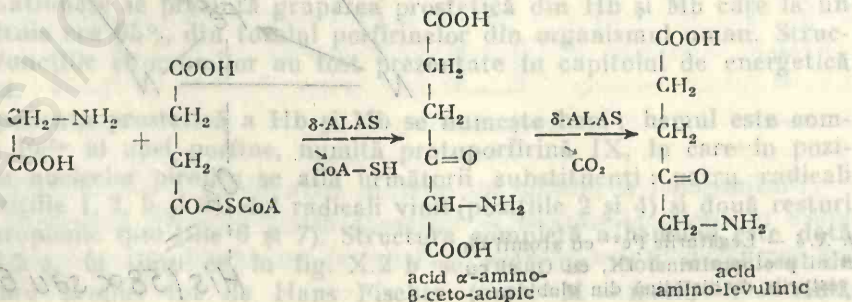
## X.2. BIOSINTEZA HEMULUI

Compușii de la care se pleacă în biosinteza hemului sînt extrem de simpli: aminoacidul glicocol și succinil~CoA care este, după cum se știe, un intermediar al ciclului acizilor tricarboxilici.

Procesul de biosinteză are loc în toate țesuturile dar cu intensitate mare se desfășoară în celulele sistemului eritroformator din măduvă, ficat și splină; primele și ultimele reacții au loc în mitocondrii, cele intermediare în citosol. Se disting următoarele etape:

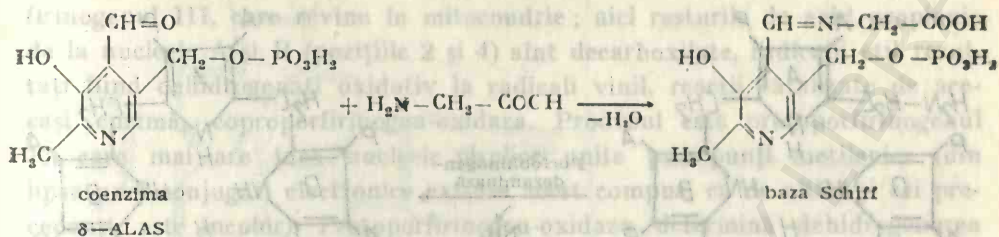
- sinteza acidului  $\delta$ -aminolevulinic;
- formarea porfobilinogenului;
- formarea protoporfirinei IX;
- unirea protoporfirinei IX cu  $\text{Fe}^{2+}$ .

Sinteza acidului  $\delta$ -aminolevulinic are loc în mitocondrii (unde se produce succinil~CoA). Simplificat, sinteza constă din două reacții catalizate de aceeași enzimă,  $\delta$ -aminolevulinatsintetaza ( $\delta$ -ALAS); mai întîi o moleculă de glicocol se condensează cu una de succinil-CoA formîndu-se un intermediar instabil, acidul  $\alpha$ -amino- $\beta$ -ceto-adipic, prin a cărui decarboxilare rezultă acidul  $\delta$ -aminolevulinic:





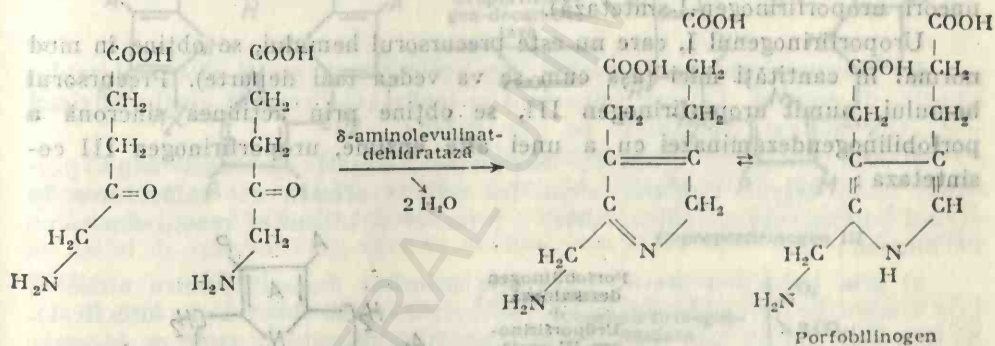
În realitate procesul este mai complicat; prima reacție are loc numai dacă glicocolul este în prealabil „activat”. Această activare constă în formarea între glicocol și piridoxalfosfat, care este coeziunea  $\delta$ -ALAS, a unei baze Schiff:



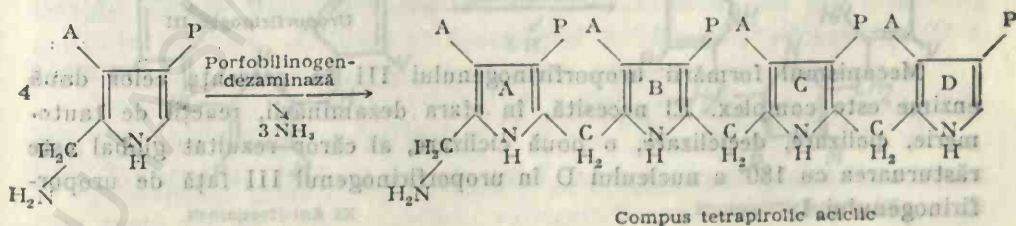
Eliberarea grupării amino are loc numai după formarea acidului  $\delta$ -amino-levulinic, printr-o reacție de hidroliză.

Următoarele reacții ale procesului de biosinteză au loc în citosol.

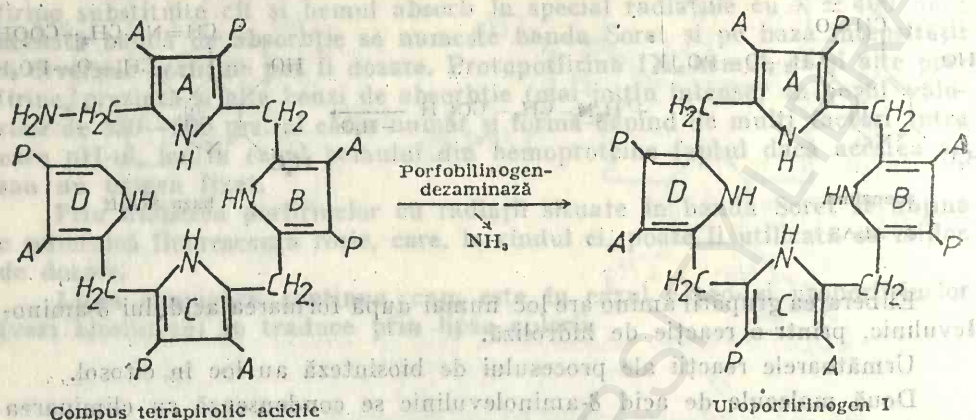
Două molecule de acid  $\delta$ -amino-levulinic se condensează cu eliminarea a două molecule de apă, formându-se porfobilinogenul, un derivat trisubstituit al pirolului. Reacția este catalizată de enzima  $\delta$ -amino-levulinatdehidratază:



Pentru înțelegerea mai ușoară, reacția următoare, a cărui produs este un compus tetrapirolic ciclic, se redă în două trepte; se consideră mai întâi condensarea a patru molecule de porfobilinogen cu eliminarea a trei molecule de  $\text{NH}_3$ , produsul fiind un compus tetrapirolic aciclic (se notează prin A radicalii  $-\text{CH}_2-\text{COOH}$  și prin P radicalii  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ):

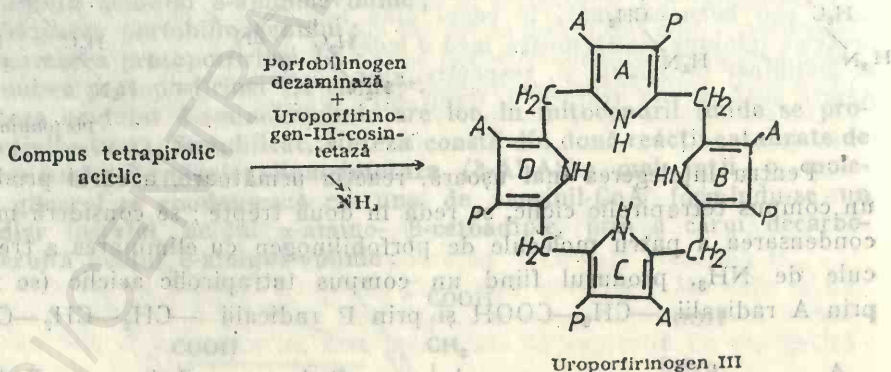


Prin eliminarea în continuare a unei molecule de  $\text{NH}_3$  (între catena laterală a pirolului A și pirolul D) se obține compusul tetrapirolic ciclic numit uroporfirinogen I:



Condensarea celor patru molecule de porfobilinogen cu formarea directă a uroporfirinogenului I este catalizată de porfobilinogendezaminază (numită uneori uroporfirinogen-I-sintetază).

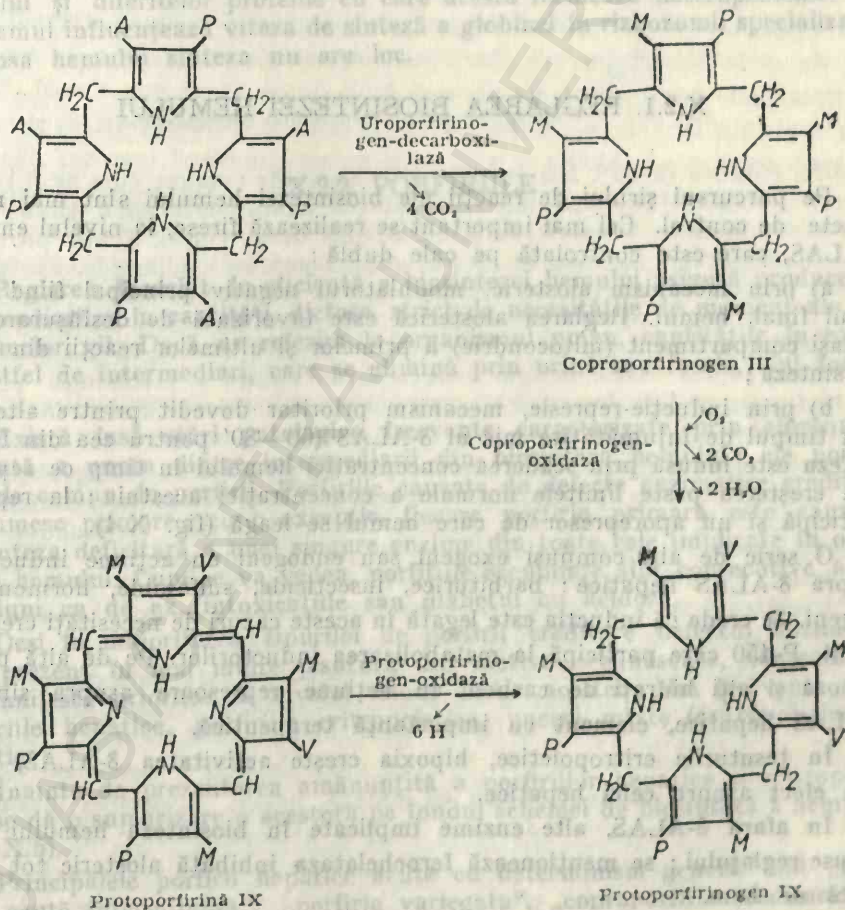
Uroporfirinogenul I, care nu este precursorul hemului, se obține în mod normal în cantități mici (așa cum se va vedea mai departe). Precursorul hemului, numit uroporfirinogen III, se obține prin acțiunea sincronă a porfobilinogendezaminazei cu a unei alte enzime, uroporfirinogen III co-sintetaza:



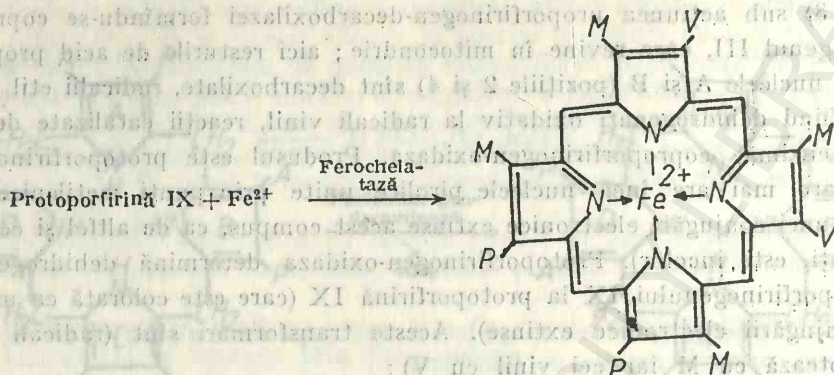
Mecanismul formării uroporfirinogenului III în prezența celor două enzime este complex. El necesită, în afara dezaminării, reacții de tautomerie, ciclizare, deciclizare, o nouă ciclizare, al căror rezultat global este răsturnarea cu  $180^\circ$  a nucleului D în uroporfirinogenul III față de uroporfirinogenul I.



Protoporfirina IX, precursorul direct al hemului, se formează din uroporfirinogenul III printr-o serie de reacții de decarboxilare și dehidrogenare. Mai întâi se decarboxilează cele patru resturi de acid acetic (pozițiile 1, 3, 5 și 8) sub acțiunea uroporfirinogen-decarboxilazei formându-se coproporfirinogenul III, care revine în mitocondrie; aici resturile de acid propionic de la nucleele A și B (pozițiile 2 și 4) sunt decarboxilate, radicalii etil rezultați fiind dehidrogenați oxidativ la radicali vinil, reacții catalizate de aceeași enzimă, coproporfirinogen-oxidaza. Produsul este protoporfirinogenul IX care mai are încă nucleele pirolice unite prin punți metilenice (din lipsa unei conjugări electronice extinse acest compus, ca de altfel și cei precedenți, este incolor). Protoporfirinogen-oxidaza determină dehidrogenarea protoporfirinogenului IX la protoporfirină IX (care este colorată ca urmare a conjugării electronice extinse). Aceste transformări sunt (radicali metil se notează cu M iar cei vinil cu V):



În celule, formarea hemului prin complexarea protoporfirinei IX cu  $Fe^{2+}$  este catalizată de hemsintetază numită și ferochelatază. *In vitro* această complexare are loc și neenzimatic, dar cu viteză mică.



Hem (protohem)

## X.2.1. REGLAREA BIOSINTEZEI HEMULUI

Pe parcursul șirului de reacții ale biosintezei hemului sînt mai multe puncte de control. Cel mai important se realizează firesc, la nivelul enzimei  $\delta$ -ALAS, care este controlată pe cale dublă :

a) prin mecanism alosteric, modulatorul negativ principal fiind produsul final, hemul. Reglarea alosterică este favorizată de desfășurarea în același compartiment (mitocondrie) a primelor și ultimelor reacții din calea de sinteză ;

b) prin inducție-represie, mecanism prioritar dovedit printre altele și prin timpul de înjumătățire mic al  $\delta$ -ALAS (60—80' pentru cea din ficat). Sinteza este indusă prin scăderea concentrației hemului în timp ce represia prin creșterea peste limitele normale a concentrației acestuia ; la represie participă și un aporepresor de care hemul se leagă (fig. X.4).

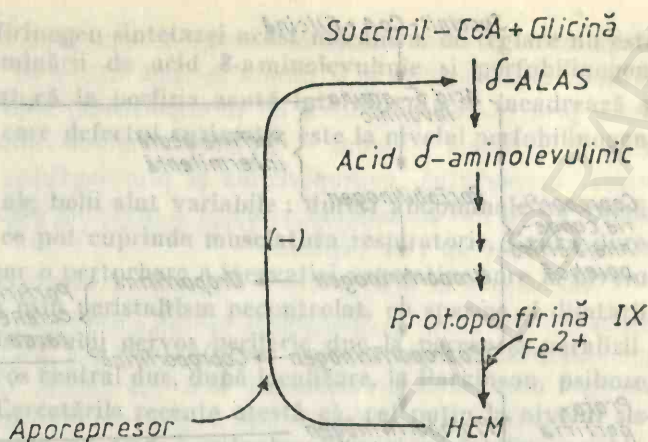
O serie de alți compuși exogeni sau endogeni au acțiune inductoare asupra  $\delta$ -ALAS hepatice : barbiturice, insecticide, sulfamide, hormoni estrogeni. Se crede că inducția este legată în aceste cazuri de necesități crescute în cit. P-450 care participă la metabolizarea inductorilor. Pe de altă parte, glucoza și alți hidrați de carbon au acțiune represoare asupra sintezei  $\delta$ -ALAS hepatice, element cu importanță terapeutică.

În țesuturile eritropoietice, hipoxia crește activitatea  $\delta$ -ALAS, fiind fără efect asupra celei hepatice.

În afara  $\delta$ -ALAS, alte enzime implicate în biosinteza hemului sînt supuse reglajului ; se menționează ferochelataza inhibată alosteric tot prin exces de hem.



Fig. X.4 — Represia prin exces de hem a  $\delta$ -ALAS.



În ultimii ani s-a arătat că există corelații între vitezele de sinteză ale hemului și diferitelor proteine cu care acesta formează heteroproteine. De ex. hemul influențează viteza de sinteză a globinei în rizbozomii specializați; în lipsa hemului sinteza nu are loc.

## X.2.2. PORFIRIILE

Reglarea deosebit de eficientă a biosintezei hemului asigură producerea intermediarilor în cantități dictate strict de necesitățile de moment ale organismelor vii. Dacă ne referim la organismul uman, cantitățile în exces de astfel de intermediari, care se elimină prin urină sau fecale, sînt foarte mici.

Există însă stări patologice frecvente caracterizate prin eliminarea crescută a unora dintre intermediarii din biosinteza hemului; ele poartă numele comun de porfirii. Porfiriile cauzate de defecte enzimatice ereditare se numesc primare; cu o excepție, fiecare porfirie primară este cauzată de sinteza deficitară a unei singure enzime din toate cele implicate în obținerea hemului. Cum se va vedea, porfiriile secundare sînt consecutive altor afecțiuni ca de ex. intoxicațiile sau diabetul cu acidoză.

Deși în majoritatea tipurilor de porfirii ereditare defectul enzymatic este prezent în mai multe țesuturi, din motive necunoscute, consecințele se manifestă prioritar la nivelul unora dintre acestea. Mai frecvente sînt porfiriile hepatice, porfiriile eritropoietice, uneori mixte (eritropoietice + hepatice).

Înainte de prezentarea amănunțită a porfiriilor hepatice și eritropoietice se dă o sumarizare a acestora pe fondul schemei de biosinteză a hemului (fig. X.5).

Principalele porfirii hepatice acute cu determinism genetic sînt „porfirie acută intermitentă“, „porfirie variegată“, „coproporfirie ereditară“ și

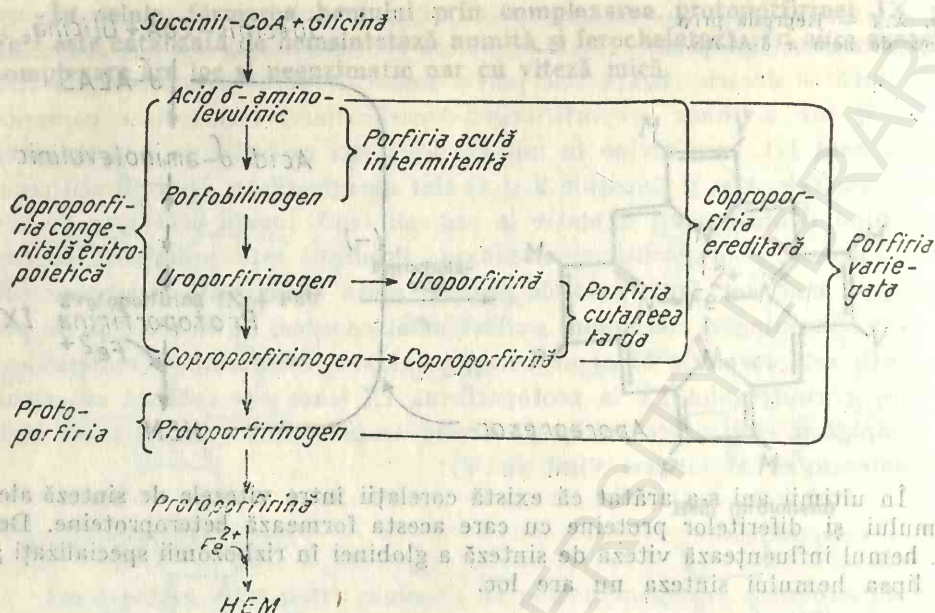


Fig. X.5 — Principalele porfirii hepatice și eritropoietice.

„porfirie cutanee tardă“. Ele au o serie de elemente comune cum ar fi transmiterea autosomal dominantă, manifestarea simptomatologică târzie, respectiv la pubertate (deseori rămânând latentă toată viața), debut provocat frecvent de factori externi, în special medicamentosi (sulfamide, estrogeni, barbiturice, anticoncepționale). Din punct de vedere biochimic, la toate trei tipurile la debut se semnalează o eliminare crescută de acid  $\delta$ -aminolevulinic și porfobilinogen în urină cit și o activitate ridicată a  $\delta$ -ALAS hepatic. Pe acest fond comun există desigur caracteristici clinice și biochimice pentru fiecare tip de porfirie hepatică ereditară, care sînt trecute sumar în revistă în continuare.

Porfirie acută intermitentă : boala apare la persoane heterozigote pentru gena responsabilă de producerea uroporfirinogensintetazei. Activitatea scăzută la cca 50% față de normali a acestei enzime determină acumularea unor cantități crescute de acid  $\delta$ -aminolevulinic și porfobilinogen care se elimină prin urină. Cei doi compuși sînt incolori ; în contact cu aerul și lumina ei se polimerizează formînd compuși colorați, ceea ce face ca urina acestor bolnavi să se închidă la culoare prin ședere.

Se susține uneori că boala ar fi determinată de o activitate crescută față de normal a  $\delta$ -ALAS în țesutul hepatic. Interpretarea acesteia este greșită, creșterea activității  $\delta$ -ALAS în fazele acute fiind un efect secundar. Cum s-a arătat anterior, activitatea  $\delta$ -ALAS este controlată prin mecanism de tip *feed-back* de produsul final al căii de sinteză, hemul. Utilizarea masivă a acestuia pentru producerea de către ficat a hemoproteinelor de tipul cit. P-450, implicate în metabolizarea medicamentelor care declanșează boala, este factorul care determină creșterea activității  $\delta$ -ALAS. La persoanele fără



defect în sinteza uroporfirinogen-sintetazei acest mecanism de reglare nu este însoțit de creșterea eliminării de acid  $\delta$ -aminolevulinic și porfobilinogen.

De curind s-a arătat că în porfiria acută intermitentă se încadrează și cazurile, foarte rare, în care defectul enzimatic este la nivelul porfobilinogen-sintetazei.

Simptomele clinice ale bolii sînt variabile: dureri abdominale cu vărsături, paralizii periferice ce pot cuprinde musculatura respiratorie. Cauza durerilor abdominale este sigur o perturbare a inervației vegetative care la nivelul intestinului se manifestă prin peristaltism necontrolat, cu spasme și dilatații. Tulburările la nivelul sistemului nervos periferic duc la pareze și paralizii; leziunile în sistemul nervos central duc, după localizare, la Parkinson, psihoze, depresii, halucinații. Cercetările recente atestă că, cel puțin la nivelul sistemului nervos, acumularea de acid  $\delta$ -aminolevulinic și porfobilinogen blochează ATP-aza Na-K.

Porfiria cutaneei tardă numită și porfiria hepatică cronică este cauzată de deficiența parțială a uroporfirinogen-decarboxilazei; defectul pare a fi transmis ca o dezordine autosomal dominantă dar penetrabilitatea este variabilă, în cele mai multe cazuri fiind dependentă de existența unor forme de leziuni hepatice (hepatite cronice, ciroze alcoolice). Caracteristicile biochimice ale bolii, cea mai frecventă dintre porfirii, sînt eliminarea urinară crescută de uroporfirinogen III și uroporfirinogen I; principala deosebire față de celelalte porfirii hepatice este că și la debutul acut al bolii eliminarea de acid  $\delta$ -aminolevulinic și porfobilinogen este doar ușor crescută sau chiar normală.

Principalele manifestări clinice sînt fotosensibilitatea cutanată (eriteme, vezicule, cicatrice), tulburări abdominale și neurologice; ele sînt exacerbate de estrogeni, alcool și de unele medicamente. Analiza de organe reliefează o fluorescență intensă a ficatului (datorată cantităților mari de porfirine) în timp ce eritrocitele și celulele măduvei spinării nu sînt fluorescente.

Coproporfiria ereditară este cauzată de defectul enzimatic ereditar în biosinteza coproporfirinogen-oxidazei, enzima mitocondrială care catalizează conversia coproporfirinogenului III în protoporfirină IX. Se caracterizează prin eliminare renală, dar și prin seaun, a unor cantități excesive de coproporfirinogen III. În contact cu aerul, coproporfirinogenul III este oxidat rapid la coproporfirină III, care este colorată în roșu. Și în cazul acestei porfirii, la debut se elimină cantități crescute de acid  $\delta$ -aminolevulinic și porfobilinogen. Sub acest ultim aspect, ca și din punctul de vedere al debutului (administrarea de medicamente ca barbituricele și tranchilizantele), inclusiv a manifestărilor clinice (dureri abdominale și afecțiuni ale sistemului nervos), coproporfiria ereditară se aseamănă cu porfiria acută intermitentă. Tabloul clinic al bolii este completat însă cu fotosensibilitatea cutanată.

Porfiria variegata sau protocoproporfiria ereditară are drept cauză, după unii autori, numai sinteza defectuoasă a protoporfirinogen-oxidazei.

După alții, la acest defect se adaugă și o incapacitate de sinteză a ferochelatazei. Boala apare rar și numai în zona Africii de Sud. Biochimic se manifestă prin excreția excesivă de protoporfirină, coproporfirină III, uroporfirină și — numai la debut — de acid  $\delta$ -aminolevulinic și porfobilinogen prin urină, uroporfirină, coproporfirină și protoporfirină prin fecale. Alături de acești precursori ai hemului apare și o porfirină atipică, notată X, hidrofilă, ce are atașat un rest peptidic.

Eliminarea de intermediari este uneori crescută și în stări latente. Plasma acestor bolnavi are o fluorescență roșie intensă.

Simptomele clinice sînt asemănătoare cu ale coproporfiriei ereditare, inclusiv sensibilitatea cutanată.

Porfiriile eritropoietice sînt „porfiria eritropoietică congenitală” și „protoporfiria”.

Porfiria eritropoietică congenitală, o boală rară, al cărei defect metabolic primar este sinteza defectuoasă a uroporfirinogen III cosintetazei. Ca urmare, se produc cantități mari de uroporfirinogen I și coproporfirinogen I care se elimină prin urină și fecale. Ca și în cazul porfiriilor hepatice, porfirinogenii se oxidează rapid la porfirinele corespunzătoare, urina căpătînd o culoare roșie și prezentînd fluorescență sub acțiunea radiațiilor ultraviolete. Fluorescență prezintă și eritrocitele. Diagnosticul diferențial față de porfiriile hepatice se bazează și pe faptul că eliminarea urinară de acid  $\delta$ -aminolevulinic și porfobilinogen este normală.

Acumularea de uro- și coproporfirinogen I în eritrocite diminuează durata de viață a acestora (prin hemoliză), scăzînd și depozitele eritrocitare din măduva osoasă. Crește eliminarea de bilirubină. Cei doi porfirinogeni I difuzează în țesuturi, în special în piele, cartilajii și rinichi.

Clinic se constată hepatomegalie, fotosensibilitate foarte mare cu producere de eriteme și vezicule care lasă cicatrice. Uneori apar deformații la față și miini. Depozitele mari de porfirinogeni I (care se transformă în porfirine I) din dinți determină colorarea în roșu a acestora și fluorescența la iradierii cu ultraviolete; acestea sînt alte caracteristici care servesc diagnosticului timpuriu al bolii.

Protoporfiria este determinată de deficiența sintezei ferochelatazei și este asociată chimic cu producerea de urticarii în urma expunerii la lumină. Eritrocitele, plasma și fecalele conțin cantități mari de protoporfirină IX, iar reticulocitele (eritrocitele tinere) și pielea prezintă fluorescență roșie.

Coproporfiriile secundare sînt mult mai frecvente decît cele determinate genetic. Multe boli între care hepatitele, anemia pernicioasă, ca și intoxicațiile cu metale grele (plumb) sau cu substanțe organice (benzen, alcool, tetraclorură de carbon) pot duce la eliminări crescute de porfirine. În bolile hepatice cu colestaze se găsesc deseori uro- și coproporfirinogenii de tip I. În general, mecanismele producerii coproporfirinogeniilor secundare nu sînt



cunoscute. La intoxicațiile cu plumb se pare că are loc o substituie a fierului cu plumbul. După caz, sinteza hemului în măduva osoasă și ficat este mai mult sau mai puțin perturbată.

### X.3. CATABOLISMUL HEMULUI

Hemul din diferitele hemoproteine se catabolizează printr-un mecanism unic dar cu viteze diferite în primele etape. La om și la animale de experiență cărora li s-a administrat glicină sau acid  $\delta$ -aminolevulinic marcați radioactiv s-a constatat apariția în timp a două maxime de producere a bilirubinei, principalul intermediar în degradarea hemului. Primul maxim apare la cca 3 zile și el corespunde formării și degradării parțiale a hemoproteinelor nehemoglobinice, în particular a cit. P-450 și catalazei; cel de al doilea maxim apare în cazul șobolanilor în intervalul de la 40 la 80 zile de la administrarea precursorilor radioactivi ai hemului. La om, al doilea maxim, care cuprinde cca 75% din radioactivitatea administrată, apare după 120 zile. Această bilirubină derivă numai din degradarea Hb știut fiind că durata de viață a eritrocitelor este chiar de 120 zile.

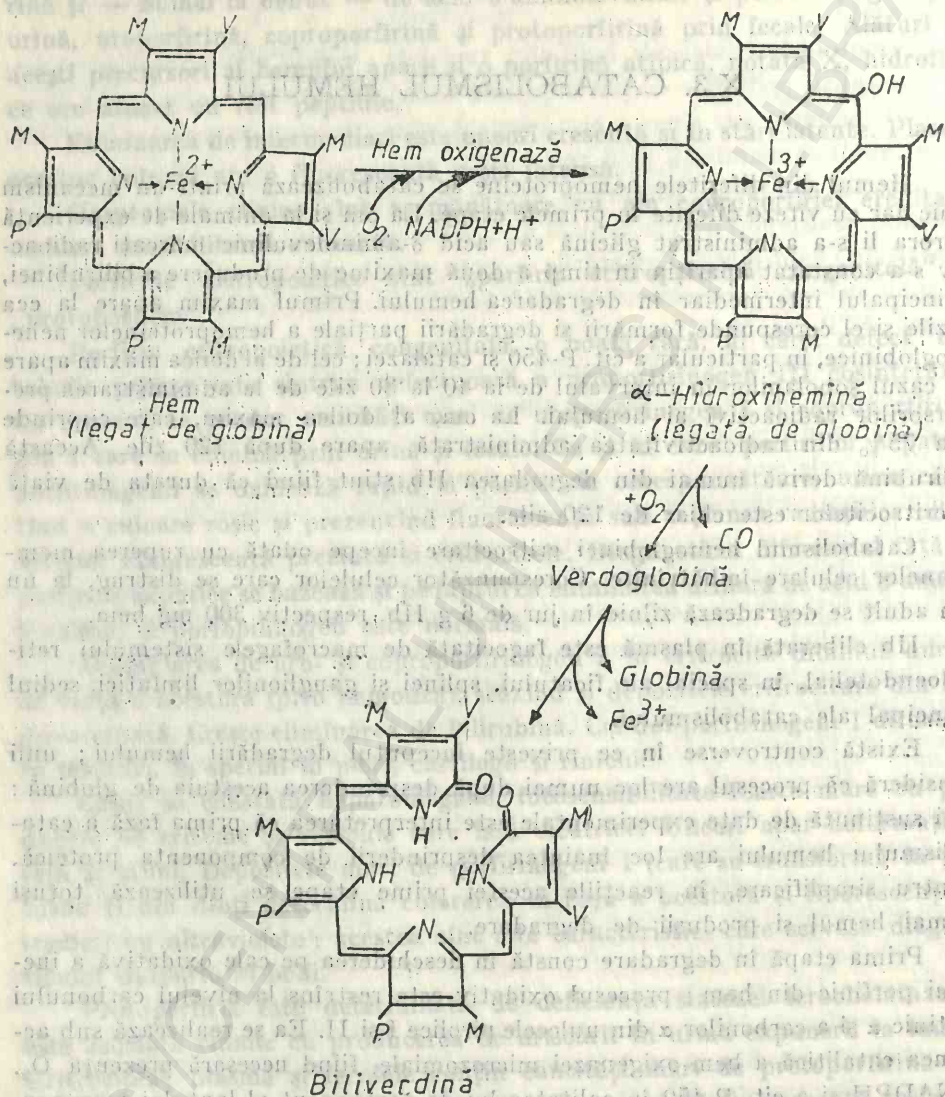
Catabolismul hemoglobinei eritrocitare începe odată cu ruperea membranelor celulare îmbătrinite. Corespunzător celulelor care se distrug, la un om adult se degradează zilnic în jur de 6 g Hb, respectiv 300 mg hem.

Hb eliberată în plasmă este fagocitată de macrofagele sistemului reticuloendotelial, în special ale ficatului, splinei și ganglionilor limfatici, sediul principal ale catabolismului.

Există controverse în ce privește începutul degradării hemului; unii consideră că procesul are loc numai după desprinderea acestuia de globină; mai susținută de date experimentale este interpretarea că prima fază a catabolismului hemului are loc înaintea desprinderii de componenta proteică. Pentru simplificare, în reacțiile acestei prime etape se utilizează totuși numai hemul și produșii de degradare.

Prima etapă în degradare constă în deschiderea pe cale oxidativă a inelului porfinic din hem; procesul oxidativ este restrâns la nivelul carbonului metinic  $\alpha$  și a carbonilor  $\alpha$  din nucleele pirolice I și II. Ea se realizează sub acțiunea catalitică a hem-oxigenazei microzomiale, fiind necesară prezența  $O_2$ , a NADPH și a cit. P-450 în calitate de component al lanțului transportor de electroni microzomial. Intermediar se obține  $\alpha$ -hidroxihemină, compus cu gruparea OH la carbonul metinic  $\alpha$  și fierul în starea oxidată,  $Fe^{3+}$ . Sub acțiunea în continuare a  $O_2$  (chiar și neenzimatic), scindarea oxidativă se desăvârșește, carbonul metinic fiind eliminat sub formă de CO iar atomii de  $C_\alpha$  din nucleele pirolice I și II sînt oxidați la grupări carbonil. Compusul aciclic oxidat al hemului, legat încă de globină, se numește verdoglobină.

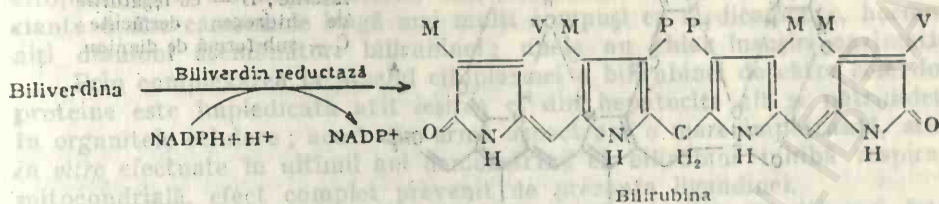
Urmează desprinderea compusului tetrapirolic aciclic oxidat de globină și  $\text{Fe}^{3+}$ ; în această formă el se numește biliverdină:



Globina eliberată poate fi reutilizată pentru sinteza hemului sau este hidrolizată la aminoacizi. Fierul intră în fondul comun al acestui element (eliminarea fierului din organism fiind infimă); el va fi utilizat imediat pentru biosinteza de hem sau va fi depozitat sub formă de feritină ori siderofilină (vezi metabolismul fierului în capitolul „Metabolism mineral“).



Catabolismul hemului continuă cu reducerea biliverdinei la bilirubină, compus de culoare galben-orange intensă; această reacție este catalizată de biliverdinreductază (coenzimă NADPH):



Deoarece bilirubina este cel mai important dintre intermediarii degradării hemului, structura și proprietățile ei au fost intens studiate. În comparație cu biliverdina, bilirubina este mai puțin polară la pH-ul fiziologic. Pe baza datelor obținute la difracția razelor X prin cristale de bilirubină s-a stabilit că formula „lineară” utilizată curent nu redă detaliile structurale; în realitate grupările carboxil ale resturilor de acid propionic formează legături de hidrogen atât cu grupările carbonil ale celor două nuclee pirolice marginale cât și cu hidrogenul de la atomii de azot ai nucleelor pirolice centrale. Dacă această structură se menține și în fluidele biologice, se explică de ce bilirubina este foarte puțin solubilă. Desfacerea parțială a legăturilor de hidrogen și ionizarea grupărilor carboxil nu este exclusă. Echilibrul celor trei forme posibile ale bilirubinei în mediile biologice este reprezentat în fig. X.6:

Etapă următoare a catabolismului hemului are loc în ficat. De aceea, bilirubina formată în alte țesuturi decât ficatul, este transportată spre acesta. Datorită insolubilității ei, transportul prin sânge se face sub forma de complex solubil bilirubină-albumină serică. Recent s-a arătat că albumina serică specifică are mai multe locusuri de legare a bilirubinei. La pH-ul fiziologic de 7,4 este ocupat complet un singur locus (legarea la acesta se face rapid și reversibil) și într-o măsură mult mai mică un al doilea locus. La valori de pH mai mici bilirubina se poate lega, cu randamente mici, la încă două locusuri. În locusul principal de legare a bilirubinei, esențial este restul de lizină 240 din albumina serică specifică.

Legarea bilirubinei de albumină poate fi inhibată competitiv de o serie de medicamente cum sînt sulfamidele și unele antiinflamatoare ca și de substanțe de contrast utilizate în colangiografie. De asemenea prezența în plasmă a unor cantități mari de acizi grași liberi determină modificări conformaționale majore în structura albuminei serice avînd ca rezultat diminuarea capacității de legare a bilirubinei.

Din motivele menționate și din altele încă necunoscute, capacitatea de legare a bilirubinei de către albumina serică este limitată (circa 25 mg bilirubină legată în sângele unui adult). Dacă bilirubina produsă în alte țesuturi decât ficatul depășește capacitatea de transport de către sânge, ea difuzează în țesuturi.

Cu toate că bilirubina este destul de puternic legată de albumină, ea este extrasă cu ușurință din sânge de către ficat. Pătrunderea în hepatocite a bilirubinei se face în formă liberă, albumina transportoare rămînînd în

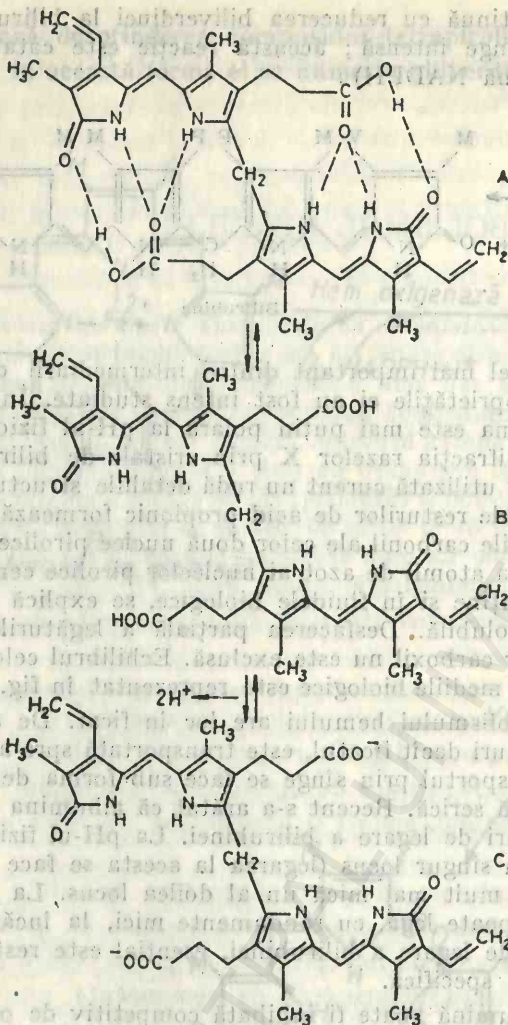


Fig. X.6 — Stările posibile ale bilirubinei în fluidele biologice; A — asociată prin legături de hidrogen interne; B — cu legăturile de hidrogen desfăcute; C — sub formă de dianion.

plasmă. Desprinderea bilirubinei de albumină este facilitată de interacția complexului cu receptorii de albumină situați la suprafața celulelor hepatice. În ce privește mecanismul trecerii bilirubinei prin membrana hepatocitului, date experimentale numeroase confirmă existența unui transportor specific (o proteină). Deoarece nu se consumă energie și nici nu este nevoie de prezența ionilor de  $\text{Na}^+$ , procesul este o difuziune facilitată. Această difuziune are loc numai dacă bilirubina este ionizată (fig. X.6); dovada o constituie inhibarea printr-un proces competitiv a difuziunii bilirubinei de către o serie de compuși organici cu structuri asemănătoare, care se află în formă dianionică.

Odată pătrunsă în hepatocit, bilirubina este complexată de către două proteine citoplasmatiche notate Y (numită „ligandină“) și Z. La concentrații mai mici ale bilirubinei ea se leagă aproape exclusiv de proteina Y, pro-

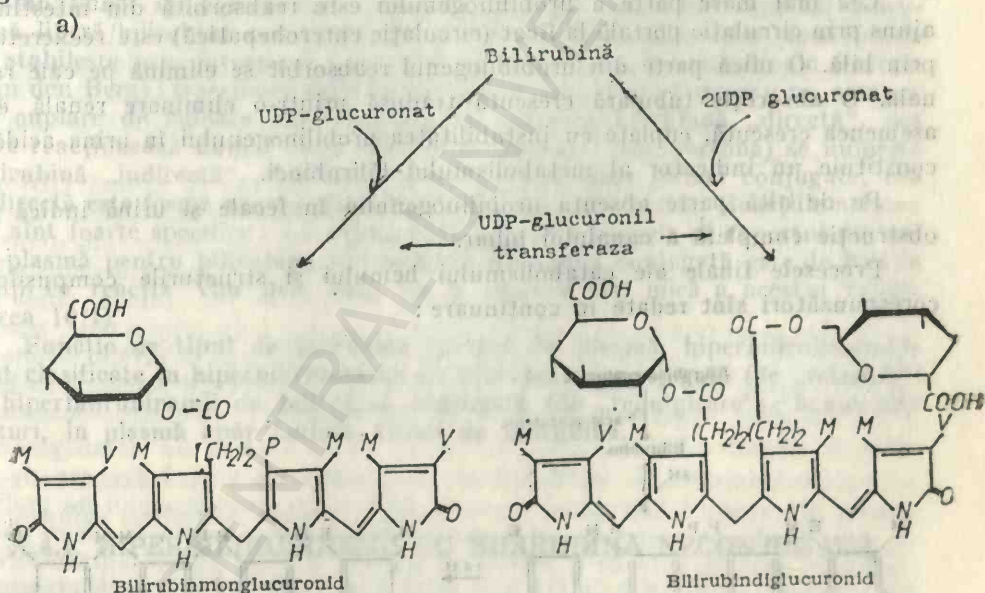


teina Z — cu afinitate mai mică — intrînd în acțiune numai la concentrații crescute ale bilirubinei.

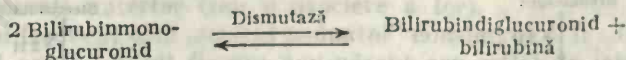
Studii recente arată că ligandina, care reprezintă circa 5% din proteinele citoplasmice ale hepatocitelor, este neunitară. Există cel puțin trei variante dintre care unele leagă mai mulți compuși ca medicamente, hormoni, alți dianioni asemănători bilirubinei; unele au chiar însușiri enzimatice.

Prin complexarea la nivelul citoplasmei a bilirubinei de către cele două proteine este împiedicată atât ieșirea ei din hepatocite cît și pătrunderea în organele celulare; acest din urmă aspect are o mare importanță, studii *in vitro* efectuate în ultimii ani demonstrînd că bilirubina inhibă respirația mitocondrială, efect complet prevenit de prezența ligandinei.

În vederea excreției biliare a bilirubinei, ea este trecută din nou într-o formă solubilă; de această dată are loc esterificarea unuia sau ambelor resturi propionil cu acidul glucuronic. Introducerea radicalilor glucuronil se face prin reacția bilirubinei cu UDP-glucuronatul în prezența UDP-glucuroniltransferazei care face parte integrantă din membrana microzomială. Se obțin bilirubinmonoglucuronidul și bilirubindiglucuronidul care la un loc poartă numele de bilirubină „conjugată”. Bilirubindiglucuronidul se obține și printr-o reacție de dismutare între două molecule de bilirubinmonoglucuronid:



b)



Forma principală a bilirubinei conjugate în ficat este de monoglucuronid.

În prezent se știe că în ficat există mai multe glucuroniltransferaze. Cea care asigură conjugarea bilirubinei catalizează și conjugarea unor

steroli; activitatea ei este indusă de substrat (bilirubina) dar și de fenobarbital.

Bilirubina conjugată este transportată activ în canaliculele biliare. Capacitatea de transport este mică în raport cu cea de conjugare astfel încât ea se constituie ca un mecanism limitativ cu răsfîngere asupra întregului metabolism al bilirubinei.

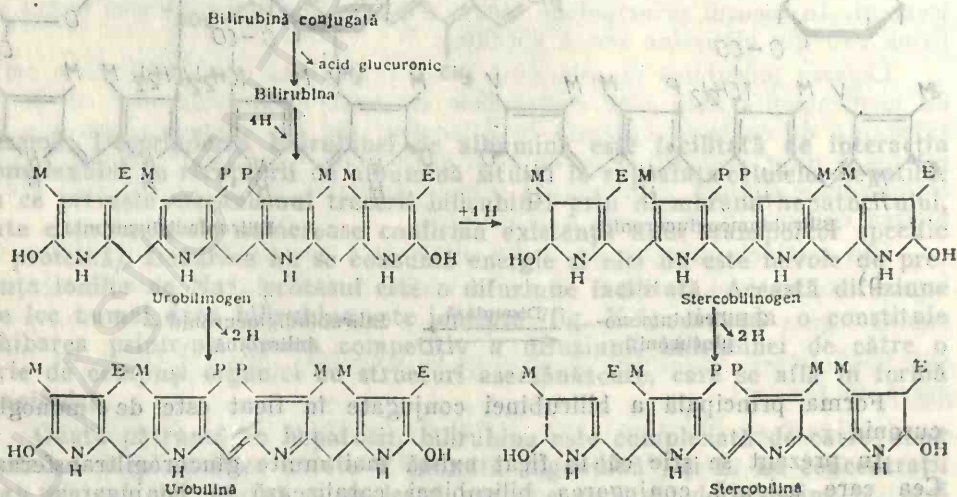
În bilă, spre deosebire de hepatocite, cea mai mare parte a bilirubinei este sub formă de diglucuronid.

Ultimele etape ale degradării hemului au loc în intestin unde bilirubina conjugată ajunge prin intermediul bilei. În ileonul terminal și în intestinul gros, resturile de acid glucuronic sînt îndepărtate sub acțiunea  $\beta$ -glucuronidazei produsă de bacteriile intestinale; bilirubina liberă este supusă unor reduceri succesive catalizate de reductaze produse tot de bacterii. Primul compus obținut prin reducere, care datorită lipsei conjugării nu are culoare, este urobilinogenul (mezobilirubinogen). O parte mică din urobilinogen este redus în continuare la stercobilinogen, de asemenea incolor. Stercobilinogenul și în mică măsură urobilinogenul sînt eliminați prin fecale. În contact cu aerul ei se oxidează parțial (dehidrogenează) trecînd în urobilină, respectiv stercobilină, care sînt colorați.

Cea mai mare parte a urobilinogenului este reabsorbită din intestin; ajuns prin circulație portală la ficat (circulație enterohepatică) este reexcretat prin bilă. O mică parte din urobilinogenul reabsorbit se elimină pe cale renală. O absorbție tubulară crescută tradusă printr-o eliminare renală de asemenea crescută, cuplate cu instabilitatea urobilinogenului în urina acidă, constituie un indicator al metabolismului bilirubinei.

Pe de altă parte absența urobilinogenului în fecale și urină indică o obstrucție completă a canalului biliar.

Procese finale ale catabolismului hemului și structurile compușilor corespunzători sînt redată în continuare:





## X.4. HIPERBILIRUBINEMIILE

La om, concentrația normală a bilirubinei serice totale variază între limitele 0,4—1 mg/100 ml. Nu se cunosc cazuri de scădere marcată a bilirubinei sub limita inferioară. În schimb, sînt frecvente cazurile depășirii limitei superioare; în aceste situații bilirubina din singe trece în țesuturi. Colorarea intensă în galben a pielii și mucoaselor este semnalul clinic primar a acestor stări cunoscute sub numele comun de icter.

Cauzele depășirii nivelului normal a bilirubinei serice sînt multiple:

- creșterea vitezei de formare a bilirubinei (deci a degradării hemoproteinelor);
- scăderea capacității de captare a bilirubinei de către ficat;
- scăderea capacității ficatului de a conjuga bilirubina;
- perturbarea mecanismului eliminării prin bilă;
- tulburări extrahepatice ale fluxului biliar.

Patologia metabolismului bilirubinei este complexă deoarece, frecvent, acționează simultan mai mulți dintre factorii enumerați.

Înainte de discutarea principalelor forme de icter se face precizarea că din punct de vedere clinic este deosebit de important raportul bilirubină liberă/bilirubină conjugată din plasmă. Concentrația celor două forme se stabilește prin intermediul reacției cu acidul diazobenzensulfonic (reacția Van den Berg); fracțiunea care formează imediat cu acest reactiv un compus de cuplare de culoare roșu-purpuriu se numește bilirubină „directă”, cea care reacționează numai după adaosul de metanol (sau acetona) se numește bilirubină „indirectă”. Bilirubina directă corespunde formei conjugate, cea indirectă este forma neconjugată, legată de albumina serică. Reacțiile acestea nu sînt foarte specifice; s-a demonstrat prin alte metode că raportul normal în plasmă pentru bilirubina neconjugată/bilirubina conjugată este de 30/1 în timp ce reacția Van den Berg dă o valoare mai mică a acestui raport (circa 10/1).

Funcție de tipul de bilirubină prezent în plasmă, hiperbilirubinemiile sînt clasificate în hiperbilirubinemii cu bilirubină neconjugată (de „retenție”) și hiperbilirubinemii cu bilirubină conjugată (de „regurgitare”); în anumite cazuri, în plasmă apar ambele tipuri de bilirubină.

### X.4.1. HIPERBILIRUBINEMII CU BILIRUBINĂ NECONJUGATĂ

Hiperbilirubinemia de acest tip poate fi cauzată de oricare dintre primii trei factori enumerați anterior (sau o asociere a lor).

Cazul cel mai frecvent este „icterul neonatal” considerat a fi „fiziologic”. După standardul omului adult fiecare nou-născut are astfel de icter, în jur de 50% fiind declarați clinic. Din studii epidemiologice a rezultat că la circa 5% dintre nou-născuți bilirubina este mai mare de 15 mg/100 ml, la aproximativ 16% este peste 10 mg, la ceilalți fiind în jur de 5—6 mg. După primele trei zile bilirubina începe să scadă revenind la normal în 7—10 zile.

Cauzele icterului neonatal sînt hemoliză accelerată corelată cu o „imaturitate” a ficatului de a prelua, conjuga și excreta bilirubina. Capacitatea de conjugare este în primul rînd afectată deoarece ficatul nu sintetizează cantitatea de UDP-glucuronat necesară conjugării. Complicații în aceste cazuri pot apărea la concentrații plasmaticice ale bilirubinei de peste 20 mg/100 ml; bilirubina neconjugată este capabilă să străbată bariera hemato-encefalică producînd encefalopatia toxică sau kernicterul. Prin capacitatea sa de a induce metabolizarea bilirubinei, fenobarbitalul are efect favorabil (ca de altfel și în alte forme de icter).

Sindromul Crigler-Najjar tip I este o boală ce se datorează unui defect genetic cu transmisie autosomal recesivă; defectul constă în incapacitatea ficatului de a sintetiza UDP-glucuroniltransferaza specifică pentru conjugarea bilirubinei. Cum s-a arătat, eliminarea bilirubinei prin bilă nu se poate face decît sub formă conjugată. De aceea, bilirubina liberă se acumulează în sînge unde concentrația rămîne constant ridicată (de regulă peste 20, uneori ajungînd la 50 mg/100 ml ser) deci lipsă totală a bilirubinei conjugate în sînge. Eliminarea de urobilinogen este foarte redusă. Funcțiile ficatului, inclusiv conjugarea altor compuși, nu sînt alterate.

Pătrunderea bilirubinei în sistemul nervos central cauzează modificări profunde (kernicter), determinînd moartea în perioada neonatală. Se citează totuși cazuri de supraviețuire pînă în jur de 20 ani.

Fenobarbitalul, în calitatea lui de inductor al metabolismului bilirubinei, este fără efect în acest sindrom. Oarecare efecte are fototerapia ( $\lambda = 425-475$  nm); se pare că prin iradiere bilirubina este fragmentată în compuși polari, eliminabili pe cale renală.

În sindromul Crigler-Najjar tip II defectul ereditar în sinteză UDP-glucuroniltransferazei (transmitere autozomal dominantă) este numai parțial. O complicație (tot de natură genetică) pare a fi conjugarea bilirubinei la bilirubindigluconid. În sînge se află, de asemenea, numai bilirubină liberă dar concentrația acesteia nu depășește 20 mg/100 ml ser. Tabloul clinic este mai puțin sever față de sindromul Crigler-Najjar tip I. În primul rînd, semnele nu apar decît în tinerețe și la adult. Nu apar complicații la nivelul sistemului nervos central. Pe de altă parte, doze mari de fenobarbital ameliorează boala fiind stimulate creșterea depozitului de bilirubină în ficat, sinteza de proteine Y și Z, creșterea fluxului biliar.

Sub denumirea de boala Gilbert se cuprind un grup heterogen de tulburări ale captării bilirubinei de către ficat și ale mecanismului de preluare a bilirubinei conjugate de către canalele biliare. În unele cazuri aceste tulburări sînt însoțite de o activitate scăzută a UDP-glucuroniltransferazei, în altele de o durată de viață mai mică a eritrocitului, deci o producție suplimentară de bilirubină. Au fost semnalate mutații în secvența proteinelor Y și Z și modificări în capacitatea de ionizare a bilirubinei. În medie, bilirubina serică nu depășește 3 mg/100 ml dar există fluctuații destul de însemnate; la acești bolnavi creșteri peste valoarea medie se semnalează în stresuri diverse, exerciții fizice, în infometare (după cca 48 ore). Patogeneza acestor procese nu este complet lămurită.

Bilirubina liberă din ser crește de asemenea în intoxicații diverse („hiperbilirubinemia toxică”): cu cloroform, tetraclorură de carbon etc.



#### X.4.2. HIPERBILIRUBINEMII CU BILIRUBINĂ CONJUGATĂ

În icterul numit „obstructiv” acumularea bilirubinei conjugate în sînge și difuzarea ei în țesuturi este urmarea blocării parțiale sau totale a canalelor biliare; mai frecvent blocarea se produce prin formarea de calculi (litiază biliară), cazurile mai rare fiind datorate tumorilor sau congestiilor în această zonă. Dacă obstrucția canalului biliar este totală, în intestin nu se mai află urobilinogen, scaunul este decolorat. Acești derivați ai bilirubinei nu se elimină nici prin urină. Nu sînt încă pe deplin cunoscute mecanismele prin care bilirubina conjugată trece din canalele biliare sau celulele hepatice în fluxul sanguin.

Icterul „idiopatic cronic” (sindromul Dubin-Johnson) este cauzat de un defect, genetic transmisibil, al secreției bilirubinei conjugate (dar și a altor compuși conjugăți) din celulele hepatice în capilarele biliare. Bilirubina serică este în mod curent puțin crescută (2—5 mg/100 ml, rareori mai mult), dar din aceasta peste 50% este conjugată. Sindromul apare rareori înaintea pubertății. Culoarea ficatului este foarte închisă datorită formării unui pigment care este destul de asemănător melaninei.

Sindromul Rotor se deosebește numai parțial de sindromul Dubin-Johnson în sensul lipsei pigmentului brun din hepatocite.

#### X.4.3. HIPERBILIRUBINEMII CU AMBELE FORME DE BILIRUBINĂ

Icterul „hemolitic” apare relativ frecvent și la adulți. Destrucția anormală a eritrocitelor poate avea diverse cauze între care și anemia pernicioasă. Degradarea masivă a hemoglobinei este posibilă datorită inductibilității hemoxigenazei. Ca urmare crește bilirubina neconjugată în fluxul sanguin. Dacă hemoliza este foarte puternică, în sînge (și deci în țesuturi) crește și bilirubina conjugată, deoarece, cum s-a arătat mai înainte, etapa limitantă de viteză în catabolismul hemului este reprezentată de trecerea bilirubinei conjugate din celulele hepatice în bilă. Degradarea masivă a hemoglobinei se traduce în acest caz și printr-o eliminare crescută de urobilinogen prin fecale și urină. Hemoliza avansată e compensată parțial printr-o intensificare a eritropoiezei în măduva osoasă.

Icterele „hepatocelulare” apar în suferințe hepatice diverse cum sînt hepatita acută virală, puseele evolutive ale hepatitelor cronice, hepatopatiile alcoolice și cirozele hepatice. În toate aceste cazuri sînt afectate atît captarea, glucuronoconjugarea cît și excreția bilirubinei. Raportul între bilirubina conjugată și cea liberă din plasmă este diferit de la o afecțiune la alta și

depinde în toate cazurile de gravitatea bolii. Cele mai mari creșteri ale bilirubinei totale se semnalează în hepatita acută virală; valoarea ei putînd atinge chiar 20 mg/100 ml plasmă. În această boală paralelismul bilirubinei cu a unor enzime serice (GOT, GPT și GIDH) este evident: creșterea concentrației bilirubinei și a activității acestor enzime în perioada de 10—14 zile de la debutul bolii și revenirea treptată la normal după 6—8 săptămîni. Dacă hepatita virală se însoțește cu fenomene colestatice pronunțate, scaunele devin palide și urobilinogenul dispare din urină (în lipsa colestazei el este decelabil la acest nivel). Reapariția urobilinogenului în urină coincide cu reluarea fluxului biliar și reflectă începutul vindecării.

Creșterile bilirubinei în puseele hepatitelor cronice și în ficatul gras de etiologie alcoolică sînt rareori peste 2—3 mg/100 ml plasmă; în ciroză, bilirubina totală variază între valoarea normală și 3—4 mg/100 ml plasmă.



## Cap. XI. METABOLISMUL NUCLEOTIDELOR PURINICE ȘI PIRIMIDINICE

Nucleotidele purinice și pirimidinice sînt biomolecule fundamentale pentru toate organismele vii, participînd la procese esențiale, dintre care :

- sînt componente structurale ale acizilor nucleici, ARN și ADN, macromolecule informaționale ;
- nucleozidele trifosforilate, în particular ATP, prin legăturile fosfat macroergice participă la tranzațiile energetice celulare ;
- nucleotidele ciclice, 3',5'-AMP și 3',5'-GMP, au roluri reglatoare ale funcțiilor celulare, sînt mediatori ai mesajelor extracelulare ;
- derivați ai nucleotidelor ca CDP-colină, CDP-diglicerid, UDP-glucoză, UDP-glucuronat, sînt intermediari activi în procese biosintetice ;
- coenzimele NAD, NADP, FAD, CoASH cuprind în structura lor și un nucleotid cu adenină.

În tabelul XI.1 sînt prezentate denumirile și prescurtările, celor mai importanți compuși din această clasă, baze azotate, nucleozide și nucleotide. În capitolele anterioare au fost tratate pe larg, structurile chimice și funcțiile unora dintre nucleotidele purinice și pirimidinice. În capitolul de față vor fi prezentate biosinteza, interconversiunile și catabolismul acestora.

### XI.1. METABOLISMUL NUCLEOTIDELOR PURINICE

Rolul major al nucleotidelor purinice este acela de componente ale acizilor nucleici, distribuția purinelor (ca și a pirimidinelor) în aceste macromolecule realizîndu-se prin mecanisme genetice. Metabolismul general al organismului trebuie să asigure existența unui fond cuprinzînd cantitatea și varietatea de nucleotide necesare sintezei de ADN și ARN. Acest fond se realizează :

- prin sinteza *de novo* a ribonucleotidelor ;
- conversia parțială a ribonucleotidelor în dezoxiribonucleotide ;
- interconversiunile nucleotidelor ;

Tabelul XI.1

## Baze, nucleozide și nucleotide purinice și pirimidinice

	Bază	Nucleozid (bază + riboză)	Nucleozid		
			Nucleozid monofosfat (NMP)	Nucleozid difosfat (NDP)	Nucleozid trifosfat (NTP)
<b>Purină</b>					
Adenină (6-amino-purină)		Adenezină	Acid adenilic, AMP	ADP	ATP
Guanină (2-amino-6-hidroxi-purină)		Guanozină	Acid guanilic, GMP	GDP	GTP
Hipoxantină (6-hidroxi-purină)		Inozină	Acid inozinic, IMP	—	—
Xantină (2,4-dihidroxi-purină)		Xantozină	Acid xantilic, XMP	XDP	XTP
Acid uric (2,4,8-trihidroxi-purină)		—	—	—	—
<b>Pirimidină</b>					
Uracil (2,4-dihidroxi-pirimidină)		Uridină	Acid uridilic, UMP	UDP	UTP
Citozină (2-hidroxi-4-aminopirimidină)		Citidină	Acid citidilic, CMP	CDP	CTP
Timină (2,4-dihidroxi-5-metil-pirimidină)		Timidină (cu deoxiriboză)	Acid timidilic, TMP	TDP	TTP
Acid orotic (2,4-dihidroxi-pirimidin-6-carboxilic)		Orotidină	Acid orotidilic, OMP	—	—



— reutilizarea bazelor purinice, ale nucleotidelor ce rezultă prin degradarea celulară a acizilor nucleici.

Toate celulele cuprind ARN și pot reutiliza, după unele remanieri, produșii de degradare. Sinteza *de novo* are loc aproape în exclusivitate în ficat de unde produșii finali sau unii intermediari sint preluați de către țesuturile extrahepatice. Se pare că eritrocitele joacă un rol important în acest transfer. Frațiunea de nucleotide purinice în exces față de nevoile organismului este convertită în acid uric, catabolit final excretabil.

## XI.1.1. BIOSINTEZA DE NOVO A NUCLEOTIDELOR PURINICE

### XI.1.1.1. Biosinteza IMP

Materiile prime pentru sinteza nucleului purinic sint reprezentate de aminoacizii : glicină, acid aspartic, glutamină, dioxid de carbon, unități  $C_1$ -tetrahidrofolat. Prin utilizarea de precursori mareați cu  $^{15}N$  și  $^{14}C$  s-a stabilit originea fiecărui atom din nucleul purinic (fig. XI.1). Totodată, aceste studii au demonstrat că păsările, mamiferele și alte specii utilizează aceleași reacții pentru sinteza nucleotidelor purinice. Riboza este furnizată de glucoză pe calea pentozofosfaților. În această cale biosintetică nu se formează baze purinice libere ci direct ribunucleotide. Legătura  $\beta$ -N-glicozidică se stabilește cu mult înaintea constituirii nucleului heterocilic. Primul ribunucleotid al secvenței *de novo* cuprinde ca bază purinică hipoxantina (6-hidroxi-purină) și poartă denumirea de acid inozinic sau inozin monofosfat (IMP). De la IMP se obțin apoi nucleotidul cu adenină (AMP) și

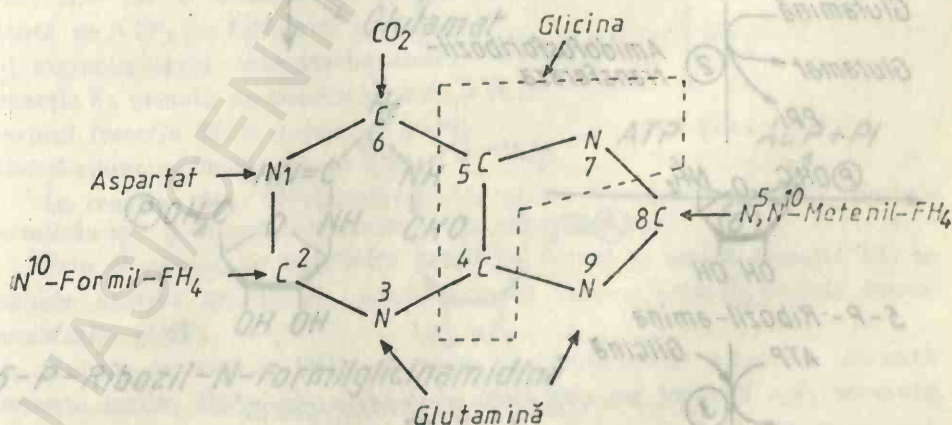
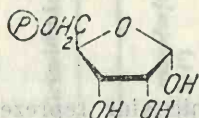


Fig. XI.1 — Precursorii nucleului purinic.

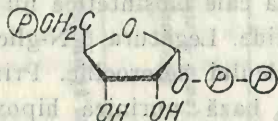
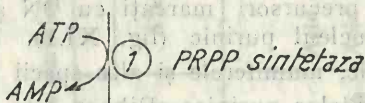
cel cu guanină (GMP). În fig. XI.2 este prezentată succesiunea reacțiilor care, pornind de la 5-fosfo-riboză, conduce la IMP.

Reacția (1) constă în activarea restului ribozil la 5-fosforibozil- $\alpha$ -1-pirofosfat (PRPP), catalizată de PRPP sintetază. PRPP este un compus cheie în metabolismul nucleotidelor, fiind precursor și al nucleotidelor pirimidinice. De asemenea PRPP furnizează restul 5-P-ribozil și în reacțiile de reciclare a bazelor purinice. PRPP sintetaza este supusă acțiunii reglatoare a diverși factori.

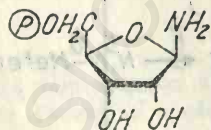
Cu următoarea reacție (2), începe, de fapt, calea specifică sintezei purinelor. Gruparea amidică a glutaminei înlocuiește restul pirofosfat din PRPP rezultând 5-fosforibozil- $\beta$ -1-amină. De remarcat schimbarea  $\alpha \rightarrow \beta$  a configurației  $C_1$  al ribozei și constituirea viitoarei legături  $\beta$ -N-glicozidică a nucleotidelor. Atomul de azot introdus corespunde la  $N_1$  purinic. Enzima, amidofosforibozil transferaza, este cel de al doilea punct de control al secvenței.



5-P-Riboză



5-Fosfo-ribozil-1-pirofosfat (PRPP)



5-P-Ribozil-1-amină

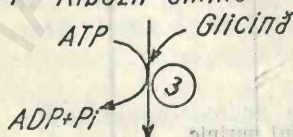
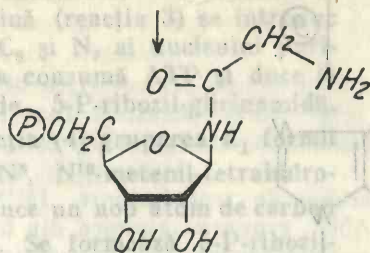
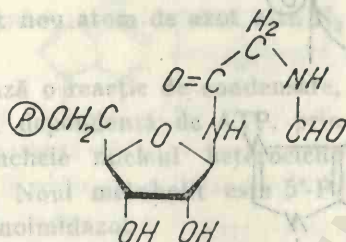
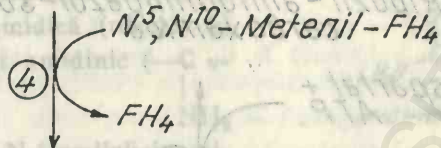


Fig. XI.2a — Biosinteza de novo a UMP.

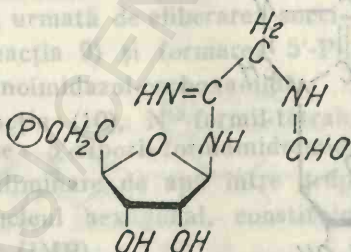
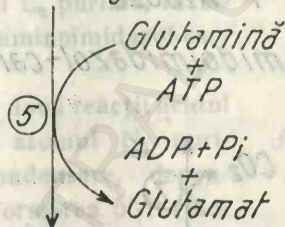




5-P-Ribozil-glicinamidă



5-P-Ribozil-N-formilglicinamida



5-P-Ribozil-N-Formilglicinamidină

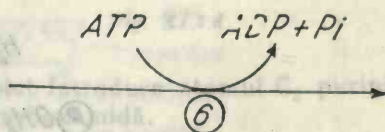
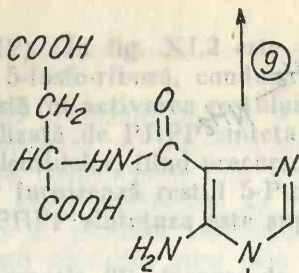


Fig. XI.2 b

cel cu gusini (CM) și XI.2 prezentată succesiunea reacțiilor care, pornind de la 5'-P-Ribozil-1-pirofosfat (PRPP), catalizate de enzime, duc la formarea de nucleotizi. De asemenea PRPP este un precursor în sinteza de nucleotizi a bazelor purinice. PRPP este un precursor în sinteza de nucleotizi a bazelor purinice.

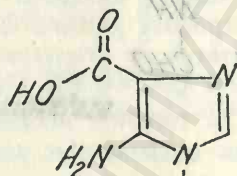


*P-Riboză*

*5'-P-Ribozil-amidoimidazol-succin-carboxamidă*

*Aspartat + ATP*

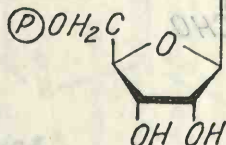
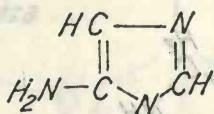
*ADP + P<sub>i</sub>*



*P-Riboză*

*5'-P-Ribozil-amidoimidazol-carboxilat*

*CO<sub>2</sub>*



*5'-P-Ribozil-aminoimidazol*

Fig. XI.2 c



Prin condensarea 5-P-ribozilamini-  
nei cu glicină (reacția 3) se introduc  
atomii C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub> și N<sub>7</sub> ai nucleului puri-  
nic. Reacția consumă ATP și duce la  
formarea de 5-P-ribozil-glicinamidă.

În reacția (4) gruparea C<sub>1</sub> formil  
cedată de N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-metenil-tetrahidro-  
folat introduce un nou atom de carbon  
(C<sub>8</sub> purinic). Se formează 5-P-ribozil-  
N-formilglicinamidă.

O nouă moleculă de glutamină  
cedează gruparea amidică (reacția 5)  
rezultând un derivat amidinic ( $\text{—C=}$   
 $\text{NH}_2$   
 $\text{=NH}$ ), 5'-P-ribozil-N-formilglicinami-  
dina. Acest nou atom de azot este N<sub>3</sub>  
purinic.

Urmează o reacție de condensare,  
reacția (6), dependentă de ATP, prin  
care se încheie nucleul heterociclic  
imidazolic. Noul metabolit este 5'-P-  
ribozil-aminoimidazol.

Prin carboxilare directă (reacția 7)  
se introduce atomul C<sub>6</sub> purinic, rezul-  
tând 5'-P-ribozil-aminoimidazol-car-  
boxilat.

În următoarele două reacții acidul  
aspartic furnizează atomul N<sub>1</sub> puri-  
nic. Are loc o condensare, depen-  
dentă de ATP, cu formarea 5'-P-ribo-  
zil-aminoimidazol-succincarboxamidă  
(reacția 8), urmată de eliberarea succi-  
natului (reacția 9) și formarea 5'-P-  
ribozil-aminoimidazol-carboxamidă.

În reacția (10), N<sup>10</sup>-formil-tetrahidrofolat introduce atomul C<sub>2</sub> purinic  
formindu-se 5'-ribozil-formamidoimidazol-carboxamidă.

Prin eliminare de apă între grupările formil și amidă (reacția 11) se  
închide nucleul hexagonal, constituindu-se ribonucleotidul purinic inozin  
monofosfat (IMP).

Sinteza *de novo* a IMP, pe lângă materiile prime amintite, necesită  
prezența ionilor Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> și ATP. Se consumă șase legături ~P, secvența  
este exergonică și ireversibilă.

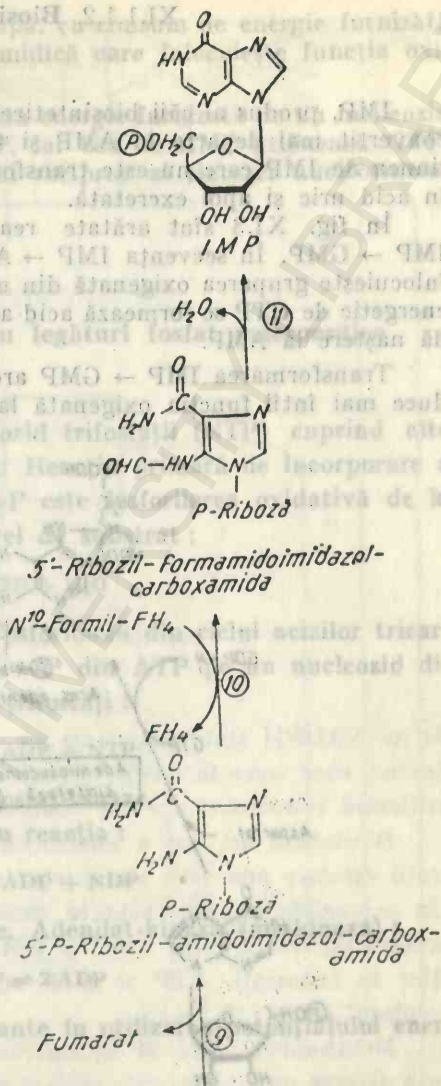


Fig. XI.2 d

### XI.1.1.2. Biosinteza AMP și GMP

IMP, produs al căii biosintetice *de novo*, nu are roluri ca atare, el fiind convertit mai departe în AMP și GMP, ribonucleotidele funcționale. Fracțiunea de IMP care nu este transformată în AMP și GMP este catabolizată în acid uric și apoi excretată.

În fig. XI.3 sint arătate reacțiile de transformare  $\text{IMP} \rightarrow \text{AMP}$  și  $\text{IMP} \rightarrow \text{GMP}$ . În secvența  $\text{IMP} \rightarrow \text{AMP}$ , gruparea aminică din acid aspartic înlocuiește gruparea oxigenată din nucleul purinic. Într-o reacție dependentă energetic de GTP se formează acid adenilsuccinic care, eliberând acid fumaric, dă naștere la AMP.

Transformarea  $\text{IMP} \rightarrow \text{GMP}$  are loc tot în două etape: în prima se introduce mai întâi funcția oxigenată la  $\text{C}_2$  cu formarea intermediară a nucleo-

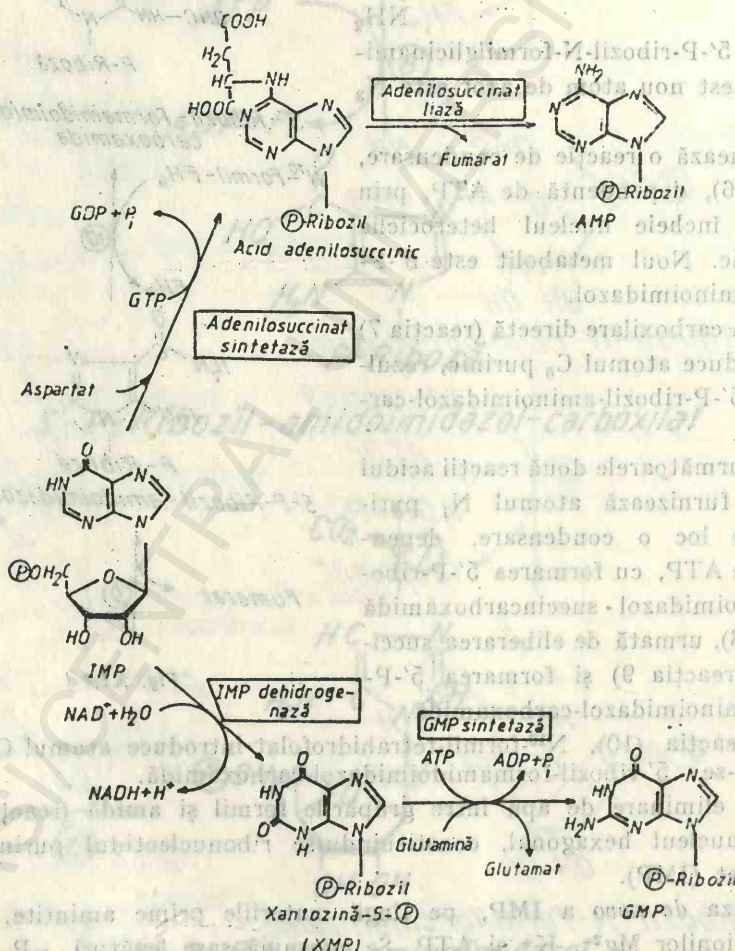


Fig. XI.3 — Biosinteza AMP și GMP.

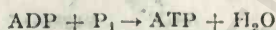


tidului cu xantină (XMP); în a doua etapă, cu consum de energie furnizată de ATP, glutamina cedează gruparea amidică care înlocuiește funcția oxigenată de la C<sub>6</sub> rezultând GMP.

Fiecare din cele două secvențe necesită energie furnizată de un nucleozid trifosfat, sinteza de GMP consumă ATP, iar cea de AMP utilizează GTP. Acest fapt oferă posibilitatea controlului reciproc al sintezei nucleotidelor cu adenină și cu guanină.

### XI.1.1.3. Biosinteza nucleotidelor cu legături fosfat macroergice

Nucleozid difosfații (NDP) și nucleozid trifosfații (NTP) cuprind câte una și respectiv, câte două grupări ~P. Reacția primară de incorporare a energiei metabolice în aceste grupări ~P este fosforilarea oxidativă de la nivelul lanțului respirator sau de la nivel de substrat:



prin care se formează ATP din ADP. Fosforilarea din ciclul acizilor tricarboxilici generează GTP. Prin transferul ~P din ATP pe un nucleozid difosfat pot fi obținuți ceilalți nucleozid trifosfați:



Reacția este catalizată de nucleozid-difosfat-kinaze.

Legătura ~P din NDP rezultă prin reacția:



catalizată la nucleozid-monofosfat-kinaze. Adenilat-kinaza (miokinaza):



este larg distribuită și are roluri importante în utilizarea potențialului energetic al sistemului adenilic.

### XI.1.1.4. Biosinteza dezoxiribonucleotidelor

Sinteza de ADN are loc numai în faza S (de sinteză) a ciclului celular care pregătește celula pentru diviziune. În celelalte faze concentrația intracelulară a dezoxiribonucleotidelor este foarte mică.

Dezoxiribonucleotidele sint obținute prin transformarea unității ribozil din nucleozid difosfați în 2'-dezoxiribozil (fig. XI.4). Echivalenții reducători

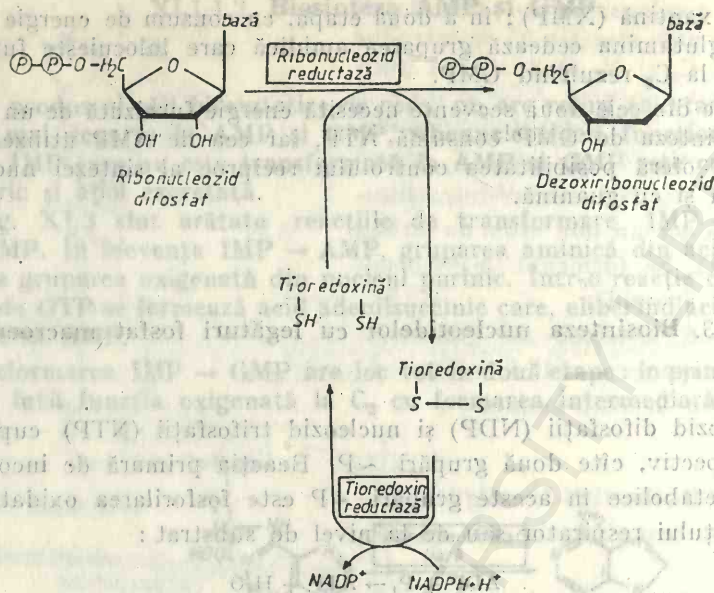


Fig. XI.4 — Biosinteza dezoxiribonucleotidelor.

de pe NADPH sînt transferați pe o proteină mică cu grupări —SH, tioredoxina, care trece în forma redusă, ditiolică. Mai departe, sub acțiunea ribonucleotid reductazei are loc reducerea restului ribozil la dezoxiribozil.

Biosinteza *de novo* a nucleotidelor purinice trebuie să asigure concentrații celulare adecvate ale acestor compuși pentru sinteza de acizi nucleici. Un mecanism reglator asigură cantitatea de IMP și un altul repartizarea acestui nucleotid între AMP și GMP. Transformarea nucleozid monofosfaților în trifosfați. ATP și GTP sînt controlate de încărcarea energetică celulară.

Metabolitul cheie al biosintezei nucleotidelor purinice este PRPP și prin diverse mecanisme este reglată atât formarea, cît și utilizarea sa. Nucleotidele AMP, GMP, ATP, GTP, produșii finali ai biosintezei *de novo*, acționează ca efectori negativi asupra PRPP sintetazei și asupra amidofosforibozil transferazei (fig. XI.5) enzime de a căror activitate depinde concentrația PRPP. De asemenea, disponibilitățile de substrat sînt factori de reglare. Pentru PRPP sintetaza concentrația celulară de 5-P-riboză determină viteza de reacție. Alte nucleotide care utilizează PRPP ca precursor, nucleotidele pirimidinice, NAD, FAD, CoA, inhibă PRPP sintetaza, gradul de inhibiție depinzînd de concentrația totală a acestor compuși. Amidofosforibozil transferaza este reglată atât de concentrația substratului PRPP, cît și de produșii finali. Enzima poate exista într-o formă mono-



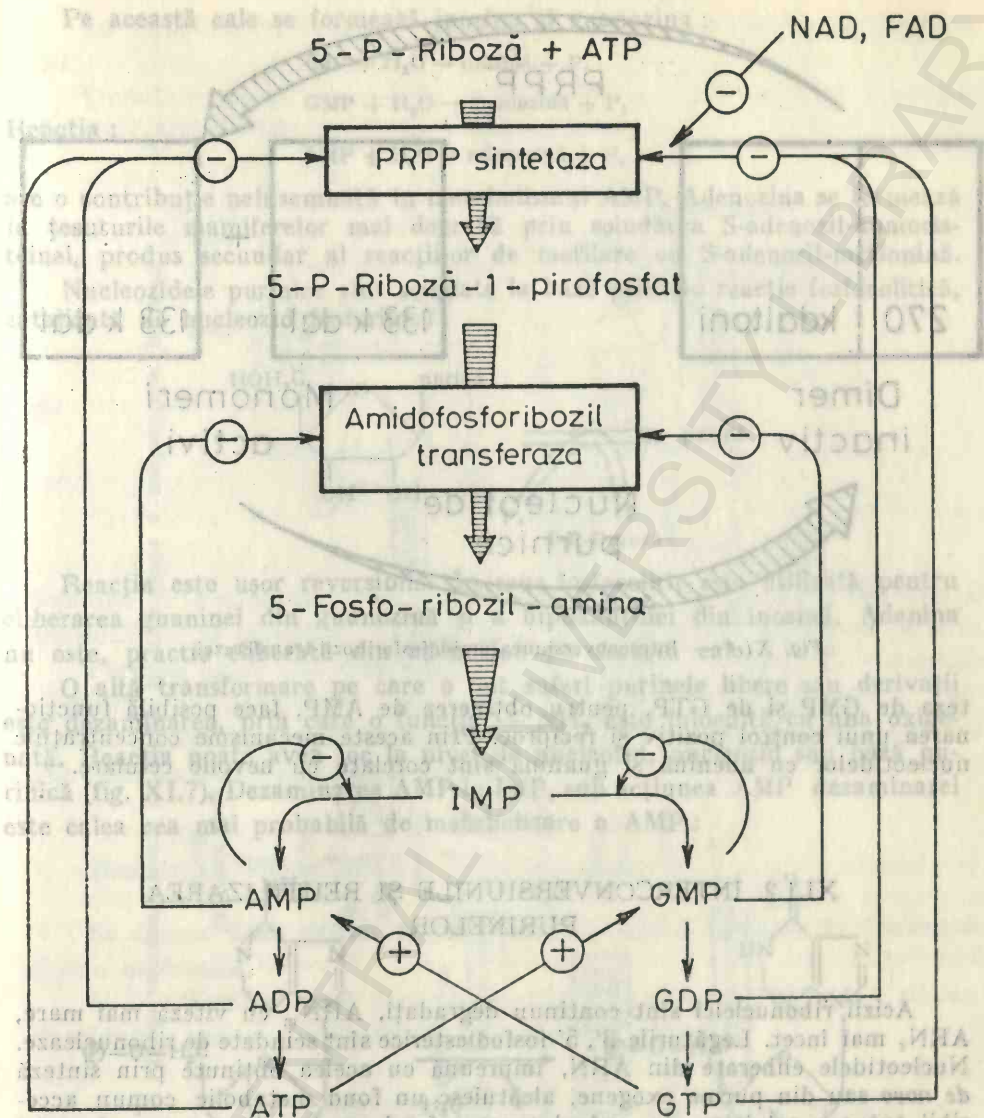


Fig. XI.5 — Reglarea biosintezei ribonucleotidelor purinice.

merieă activă catalitic, și una dimerică inactivă (fig. XI.6). Creșterea concentrației PRPP promovează depolimerizarea asociată cu activarea enzimei; nucleotidele purinice acționează în sens opus, dimerizarea enzimei și scăderea eficienței catalitice. Glutamina, co-substrat al amidofosforibozil transferazei, accelerează reacția și crește fluxul de metaboliti pe calea biosintetică.

Transformările  $\text{IMP} \rightarrow \text{AMP}$  și  $\text{IMP} \rightarrow \text{GMP}$  sint reglate prin inhibiție feed-back de produșii finali (fig. XI.5). În plus, nevoia de ATP, pentru sin-

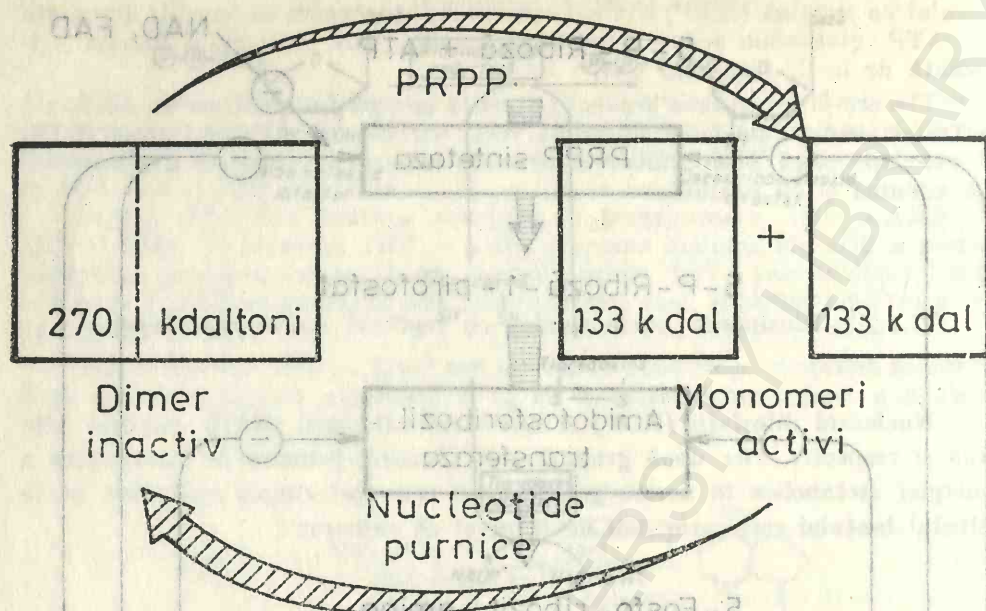


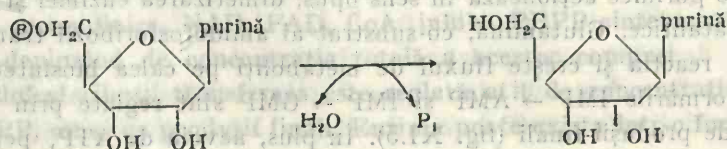
Fig. XI.6 — Interconversiunea amidofosforibozil-transferazei.

teza de GMP și de GTP, pentru obținerea de AMP, face posibilă funcționarea unui control pozitiv și reciproc. Prin aceste mecanisme concentrațiile nucleotidelor cu adenină și guanină sunt corelate cu nevoile celulare.

## XI.1.2. INTERCONVERSIUNILE ȘI REUTILIZAREA PURINELOR

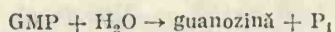
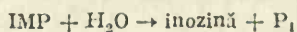
Acizii ribonucleici sunt continuu degradați,  $ARN_m$  cu viteză mai mare,  $ARN_r$  mai încet. Legăturile 3', 5'-fosfodiesterice sunt scindate de ribonucleaze. Nucleotidele eliberate din  $ARN$ , împreună cu acelea obținute prin sinteză *de novo* sau din purine exogene, alcătuiesc un fond metabolic comun accesibil tuturor celulelor. În cadrul acestui fond au loc diverse transformări și interconversiuni prin care se realizează raportul optim între nucleotide pentru sinteza de acizi nucleici. Fracțiunea de purine în exces față de nevoi va fi transformată în acid uric și eliminată din organism.

Nucleotidele pot fi transformate în nucleozide prin hidroliză, catalizată de 5'-nucleotidaze sau de fosfataze nespecifice :

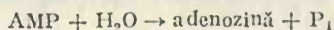




Pe această cale se formează inozina și guanozina :

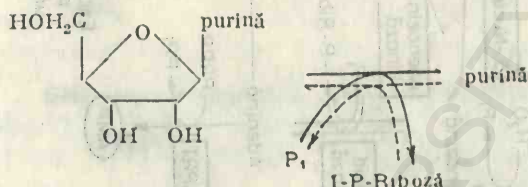


Reacția :



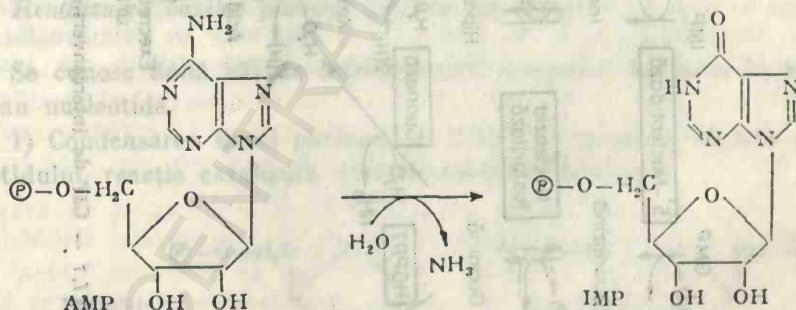
are o contribuție neînsemnată în metabolismul AMP. Adenozina se formează în țesuturile mamiferelor mai degrabă prin scindarea S-adenozil-homocisteinei, produs secundar al reacțiilor de metilare cu S-adenozil-metionină.

Nucleozidele purinice sint scindate la baze printr-o reacție fosforolitică, catalizată de nucleozid fosforilaze :

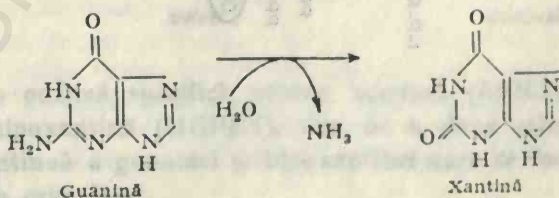


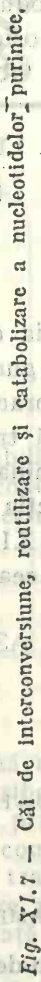
Reacția este ușor reversibilă. În sens fosforolitic este utilizată pentru eliberarea guaninei din guanozină și a hipoxantinei din inozină. Adenina nu este, practic eliberată din adenozină pe această cale.

O altă transformare pe care o pot suferi purinele libere sau derivații este dezaminarea, prin care o funcție  $-\text{NH}_2$  este înlocuită cu una oxigenată. Reacția poate avea loc la nivel de nucleotid, nucleozid sau bază purinică (fig. XI.7). Dezaminarea AMP la IMP, sub acțiunea AMP dezaminazei este calea cea mai probabilă de metabolizare a AMP :



Guanin-dezaminaza (guanaza) transformă guanina în xantină :

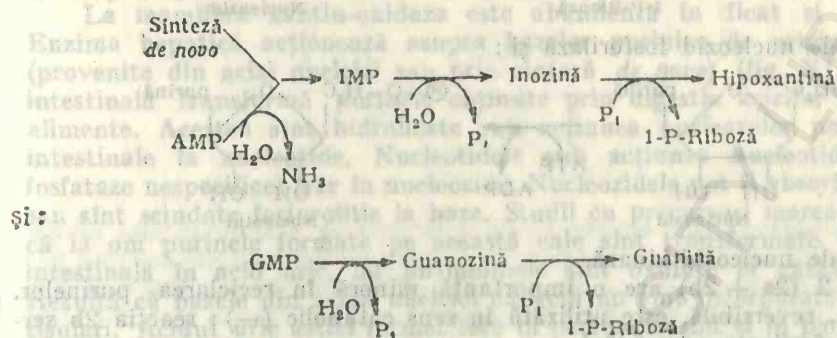






La mamifere este absentă enzima care transformă adenina în hipoxantină.

Ținându-se seama de distribuția și activitățile enzimelor, căile principale prin care sînt eliberate purinele din nucleotide sînt :



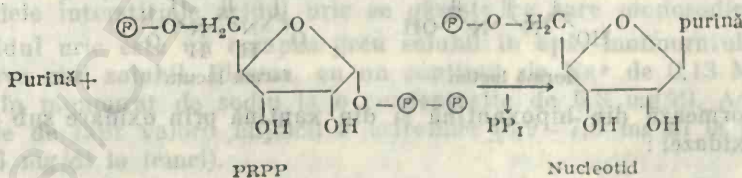
Guanina și hipoxantina sînt purinele eliberate în cursul metabolismului nucleotidelor la mamifere. Adenina se formează în cantități extrem de mici.

Purinele libere sînt reîncorporate, în cea mai mare parte, în nucleotide și utilizate din nou pentru sinteza de acizi nucleici (salvage pathway). Guanina și hipoxantina neutilizate sînt catabolizate la acid uric. Adenina este excretată ca atare prin urină (fig. XI.7).

### Reutilizarea bazelor purinice (salvage pathway)

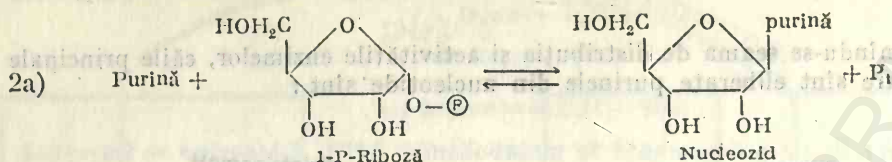
Se cunosc două căi de reîncorporare a bazelor purinice în nucleozide și/sau nucleotide.

1) Condensarea bazei purinice cu PRPP și formarea directă a ribonucleotidului, reacție catalizată de fosforiboziltransferaze :

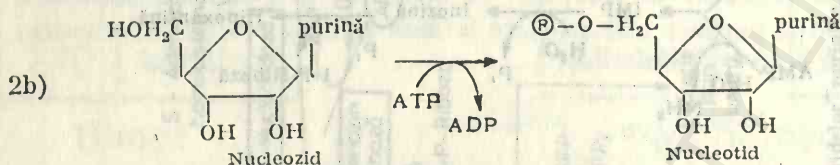


Există o enzimă specifică pentru adenină (APRT) și o alta pentru guanină și hipoxantină (HGPRT). Cea de a doua este răspunzătoare de reciclarea continuă a guaninei și hipoxantinei care se formează în cantități apreciabile în organism.

## 2) Încorporarea purinei în nucleotid în două etape:



catalizată de nucleozid fosforilază și:



catalizată de nucleozid-kinază.

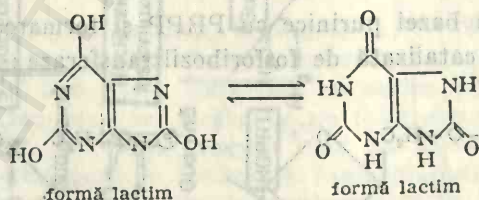
Calea 2 (2a + 2b) are o importanță minoră în reciclarea purinelor. Reacția 2a, reversibilă, este utilizată în sens catabolic ( $\leftarrow$ ); reacția 2b servește la fosforilarea adenozei.

Reutilizarea bazelor purinice are loc în toate țesuturile fiind un proces mult mai economic decât sinteza *de novo*. Pornindu-se de la purină și 1-P-riboză se cheltuiesc două legături  $\sim P$  față de 7 necesare sintezei *de novo*.

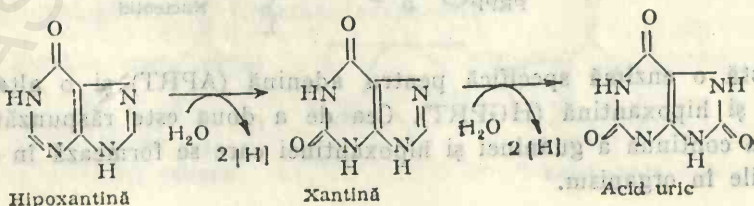
## XI.1.3. CATABOLISMUL PURINELOR

Bazele purinice, endogene sau exogene, care nu sînt incorporate în nucleotide sînt transformate în acid uric și eliminate pe cale renală.

Acidul uric (2,6,8-trihidroxi-purină) are ca formă stabilă cea lactam (cetonică):



Se formează din hipoxantină și din xantină prin oxidare sub acțiunea xantin oxidazei:





Xantin-oxidaza are o structură dimerică și o masă de aproximativ 275 kdaltoni. Cuprinde două molecule de FAD, 2 atomi de molibden și 8 atomi de fier care participă la transportul intermediar al echivalenților reducători pînă la dioxigen. În cursul acestei reacții are loc reducerea mono-electronică a dioxigenului ( $O_2 + e \rightarrow O_2^-$ ) și formarea ionului superoxid, sursă potențială a altor radicali ai oxigenului.

La mamifere xantin-oxidaza este abundentă în ficat și în intestin. Enzima hepatică acționează asupra bazelor purinice de origine endogenă (provenite din acizi nucleici sau prin sinteză *de novo*) (fig. XI.7). Enzima intestinală transformă purinele obținute prin digestia acizilor nucleici din alimente. Acestea sînt hidrolizate sub acțiunea nucleazelor pancreatice și intestinale la nucleotide. Nucleotidele sub acțiunea nucleotidazelor (sau fosfataze nespecifice) trec în nucleozide. Nucleozidele pot fi absorbite ca atare sau sînt scindate fosforolitic la baze. Studii cu precursori marcați au arătat că la om purinele formate pe această cale sînt transformate în mucoasa intestinală în acid uric, iar pirimidinele sînt oxidate la cataboliți finali. Rezultă că bazele din acizii nucleici exogeni nu sînt incorporate în compuși tisulari. Acidul uric astfel format este în parte absorbit și în parte eliminat, după ce suferă unele transformări în prezența florei bacteriene.

La mamifere acidul uric este un catabolit final și reprezintă forma de eliminare a azotului purinic. La alte specii, păsări, reptile, acidul uric joacă rolul și de catabolit al azotului proteic. Astfel de specii sînt denumite uricotelice, față de cele ureotelice, care elimină azotul proteic ca uree. Uricotelismul reprezintă o adaptare a viețuitoarelor la un mediu sărac în apă, acidul uric puțin solubil este excretat în stare semisolidă. Eliminarea de uree, ușor solubilă, antrenează pierderi mari de lichide din organism.

Ținîndu-se seama de cele arătate mai înainte (fig. XI.7) acidul uric se formează din :

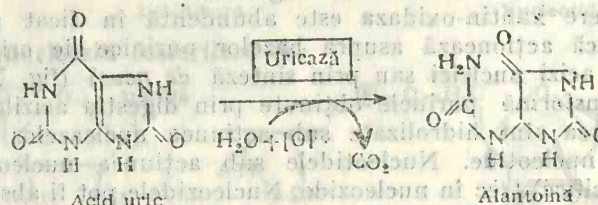
- nucleotidele exogene și sinteza sa are loc în intestin ;
- nucleotidele AMP și GMP rezultate prin degradarea acizilor ribonucleici celulari ;
- nucleotide provenite prin sinteza *de novo* (IMP, GMP, AMP) și neutilizate la formarea de acizi nucleici ca urmare a unui dezechilibru între sinteză și nevoi.

Acidul uric are două funcții acide, una mai tare cu  $pK = 5,75$ , reprezentată de gruparea  $=\overset{9}{N}-H$  și alta cu  $pK = 10,3$ ,  $=\overset{1}{N}-H$ . În plasmă și lichidele interstițiale acidul uric se găsește ca sare monosodică.

Acidul uric este un compus greu solubil în apă, monouratul de sodiu fiind ceva mai solubil. Plasma, cu un conținut de  $Na^+$  de 0,13 M este saturată în monourat de sodiu la o concentrație de 6,8 mg/dl. Aceasta corespunde de fapt valorii mijlocii a uricemiei (6,9—7,5 mg/dl la bărbați și 5,7—6,6 mg/dl la femei).

Eliminarea renală a monouratului de sodiu este un proces complex, desfășurat în patru timpi, filtrare glomerulară, reabsorbție tubulară, secreție și reabsorbție tubulară postsecretorie. Pe măsură ce procesul de acidifiere a urinei progresează uratul trece în acid uric. La un  $pH = 5,75$  uratul și acidul uric coexistă în cantități egale iar la  $pH < 5$  predomină acidul uric, mai puțin solubil. Excreția de acid uric în 24 ore este de 400—500 mg

Acidul uric este o substanță ușor oxidabilă și prin capacitatea sa de a capta radicali liberi este încredințat ca factor protector față de agresiunea oxidantă continuă la care sînt expuse majoritatea țesuturilor organismului. Cele mai multe dintre mamifere posedă o enzimă, uricaza, care transformă acidul uric în alantoină:



Enzima este absentă totemai la acele specii (om, maimuță) care nu pot sintetiza acid ascorbic. Se consideră că funcția antioxidantă a acidului uric ar compensa incapacitatea unor organisme de a sintetiza acidul ascorbic, compus major al potențialului antioxidgenic.

#### XI.1.4. PATOLOGIA METABOLISMULUI PURINELOR

**Guta** este o maladie a cărei tulburare biochimică majoră este hiperuricemia. Clinic se manifestă prin dureri artritice episodice sau cronice, nefrolitiază și depozite de acid uric în țesuturi moi (tofi gutoși). Guta primară este determinată de o eroare metabolică înăscută prin care se sintetizează acid uric în exces (majoritatea cazurilor) sau este încetinit clearance-ul acidului uric (gută renală). Hiperuricemia mai poate să apară ca o consecință a altor tulburări (gută secundară).

Turnover-ul rapid al acizilor nucleici (leucemii, anemie hemolitică, iradiere) este asociat cu hiperuricemii.

Creșterea concentrației uratului în sânge și în lichidele interstițiale, depășirea pragului de solubilitate, determină precipitarea uratului monosodic, în primul rînd în jurul articulațiilor de la extremități. Reacția inflamatorie declanșată de cristalele de urat fagocitate de leucocite stă la baza crizelor de artrită gutoasă. La nivel renal este favorizată formarea de calculi de urat și, în urinele mai acide, de acid uric.

Mecanismele patologice ale hiperuricemiei sînt eterogene și complexe. Creșterea concentrației PRPP, metabolit cheie în sinteza *de novo* și la reutilizarea bazelor purinice, este factorul etiopatogenic principal al hiperuricemiei. Creșterea fondului de PRPP este rezultatul unei sinteze crescute sau încetinirii ritmului de utilizare. Au fost descrise mai multe deficite enzimatice care măresc fondul de PRPP și, respectiv, determină hiperuricemie.

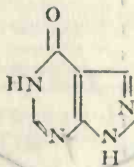
a) Variante de PRPP sintetază cu activitate catalitică crescută sau cu sensibilitate redusă la inhibiția prin produși finali.

b) Deficiența de HGPRT, enzima cheie a reutilizării guaninei și hipoxantinei.



c) Deficiența de glucozo-6-fosfatază; absența acestei enzime împiedică eliberarea glucozei din glucozo-6-P și acesta din urmă este pompat pe calea pentozo-fosfaților cu producere în exces de ribozo-5-P, materia primă din care se obține PRPP.

Hiperuricemiile, primare sau secundare, sînt corectate prin administrare de alopurinol. Acest compus, analog structural al hipoxantinei:



inhibă xantin-oxidaza și împiedică transformarea hipoxantinei în xantină și a acesteia din urmă în acid uric. În aceste condiții, hipoxantina și xantina sînt excretate drept cataboliți finali ai purinelor. Hipoxantina și xantina sînt mult mai solubile decît acidul uric, nu se depun în țesuturi, evitîndu-se efectele nocive ale hiperuricemiilor. În plus, hipoxantina și xantina în exces favorizează conversia lor în ribonucleotide (sub acțiunea fosforiboziltransferazei), cu scăderea concentrației PRPP și micșorarea fluxului de metaboliți spre sinteză *de novo*.

Sindromul Lesch-Nyhan este caracterizat prin hiperuricemie severă și prin manifestări neurologice bizare, agresivitate, tendință la automutilare, deficiență mintală. Deficitul biochimic, bine caracterizat, constă în deficiența totală a hipoxantinguanin-fosforibozil-transferazei, cu pierderea capacității de reutilizare a bazelor purinice. Ca urmare, crește concentrația PRPP și ritmul sintezei *de novo*. Gena defectă este situată pe cromozomul X și deficitul enzimatic complet se manifestă numai la bărbați. Bazele biochimice ale manifestărilor neurologice nu sînt cunoscute.

## XI.2. METABOLISMUL NUCLEOTIDELOR PIRIMIDINICE

Nucleotidele pirimidinice au roluri similare cu acelea purinice și metabolismul acestor compuși prezintă multe elemente comune, alături de trăsături specifice.

a) Bazele pirimidinice sînt sintetizate din precursori simpli, aminoacizi și  $\text{CO}_2$  (fig. XI.8).

b) 5-Fosforibozil- $\alpha$ -1-pirofosfat (PRPP) este precursor al restului 5-P-ribozil din nucleotidele pirimidinice dar legătura N-glicozidică se realizează după constituirea nucleului pirimidinic (nu înainte ca în cazul nucleotidelor purinice).

c) Fondul de unități  $\text{C}_1\text{-FH}_4$  furnizează gruparea metil din timină.

d) Biosinteza *de novo* a pirimidinelor este inhibată atît de nucleotide pirimidinice cît și purinice.

Glutamină

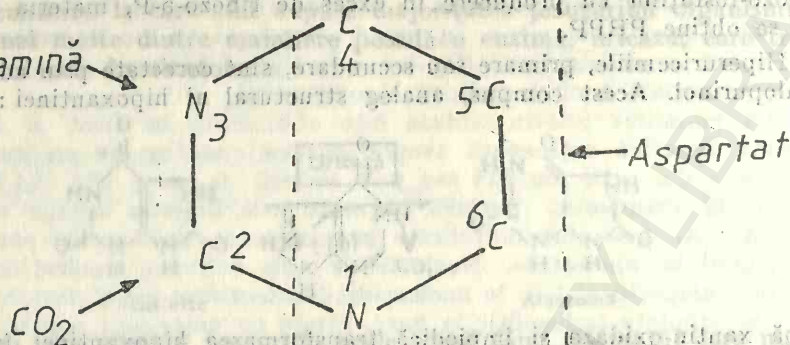


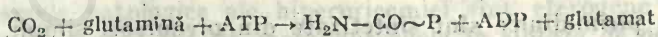
Fig. XI.8 — Precursorii nucleului pirimidinic.

e) Producții de degradare a acizilor nucleici tisulari pot fi reciclați. La pirimidine funcționează mecanisme eficiente de reutilizare a nucleozidelor și nu a bazelor.

f) Dezoxiribonucleotidele pirimidinice sînt obținute în mod similar cu acelea purinice.

### XI.2.1. BIOSINTEZA DE NOVO A NUCLEOTIDELOR PIRIMIDINICE

Sinteza nucleotidelor pirimidinice utilizează ca materii prime aminoacizi, CO<sub>2</sub>, unități active C<sub>1</sub>, PRPP (fig. XI.9). Primul metabolit al căii, carbamil fosfatul, este comun și pentru ureogeneză. Există însă două fonduri celulare de carbamil fosfat, unul mitocondrial, ureogenetic, și altul citosolic, pirimidinogenetic. Enzimele care generează carbamil fosfat sînt distincte, utilizează surse diferite de azot, NH<sub>3</sub> cea ureogenetică și glutamină cea pirimidinogenetică, reacția (1) fig. XI.9:



Prima reacție specifică biosintezei de pirimidine (reacția 2) este catalizată de aspartat transcarbamilază și conduce la formarea acidului carbamilaspartic. Prin condensarea acestuia din urmă (reacția 3) se închide nucleul heterociclic și după dehidrogenare (reacția 4) se obține un compus pirimidinic, acidul orotic (2,4-dihidroxi-6-carboxi-pirimidină). În reacția 5 are loc transferul restului 5-P-ribozil din PRPP pe acidul orotic rezultînd un nucleotid, acid orotidilic (orotidinmonofosfat, OMP). Enzima care inter-



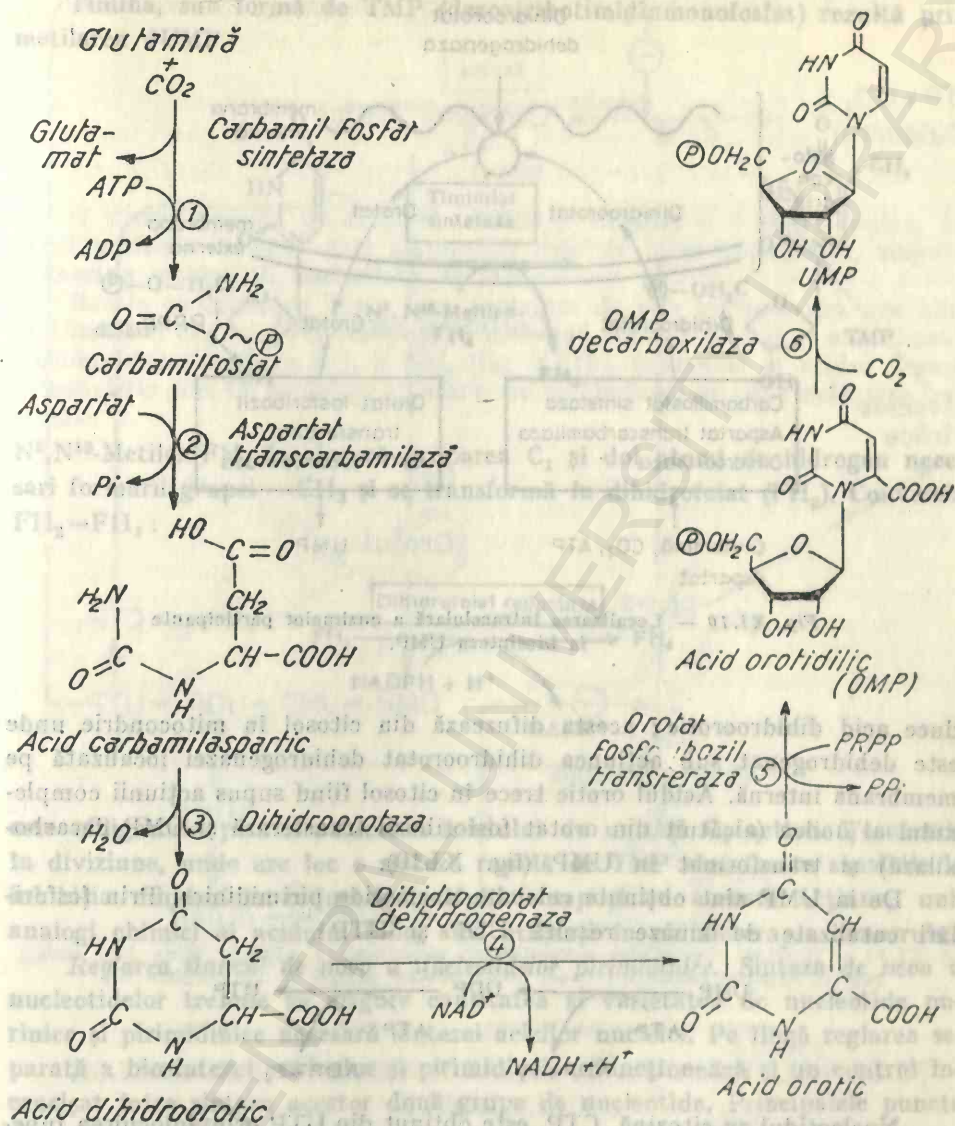


Fig. XI.9. — Biosinteza de novo a UMP.

vine în această etapă, orotat-fosforibozil-transferaza este similară cu HGPRT și APRT. Primul nucleotid pirimidinic funcțional UMP, se formează prin decarboxilarea OMP (reacția 6).

Enzimele căii de sinteză a UMP au o localizare dublă, citosolică (enzimele 1—3 și 5—6) și mitocondrială (enzima 4). Enzimele citosolice sînt organizate în două complexe multienzimatice. Primul complex, alcătuit din carbamil-fosfat-sintetază, aspartat-transcarbamilază și dihidroorotază, pro-

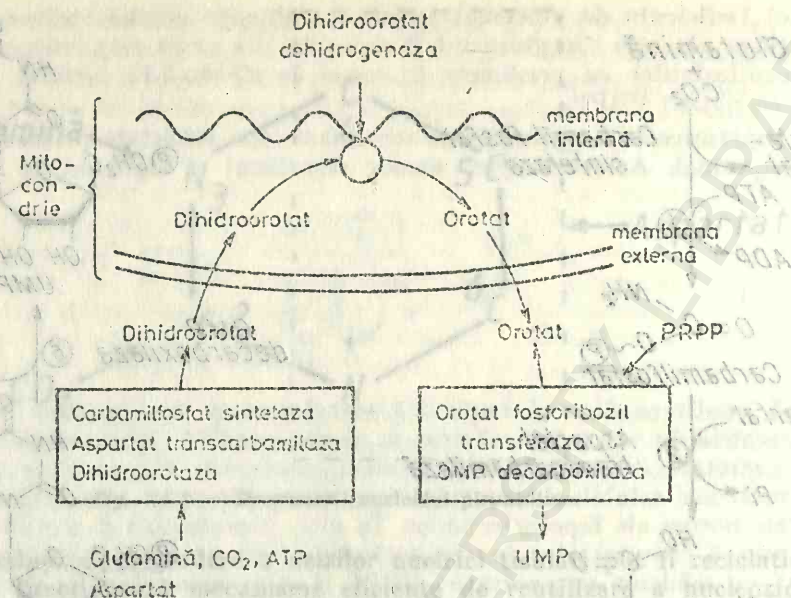
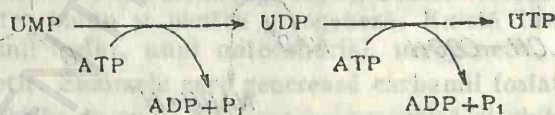


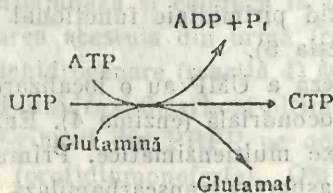
Fig. XI.10 — Localizarea intracelulară a enzimelor participante la biosinteza UMP.

duce acid dihidroorotic; acesta difuzează din citosol în mitocondrie unde este dehidrogenat sub acțiunea dihidroorotat dehidrogenazei localizată pe membrana internă. Acidul orotic trece în citosol fiind supus acțiunii complexului al doilea (alcătuit din orotat fosforibozil transferază și OMP decarboxilază) și transformat în UMP (fig. XI.10).

De la UMP sint obținute celelalte nucleotide pirimidinice. Prin fosforilări catalizate de kinaze rezultă UDP și UTP:

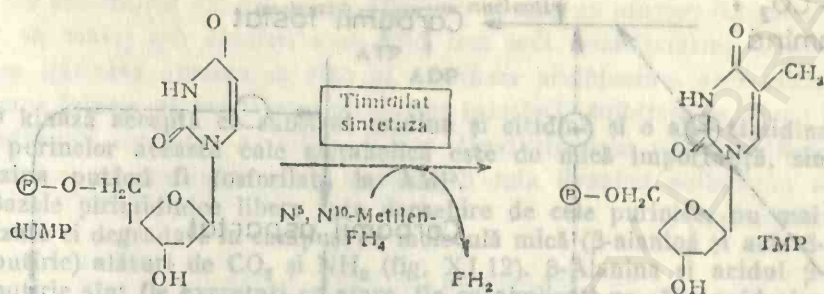


Nucleotidul cu citozină, CTP, este obținut din UTP prin înlocuirea funcției oxigenate de la C<sub>4</sub> cu gruparea aminică furnizată de glutamină (sub acțiunea CTP sintetazei):

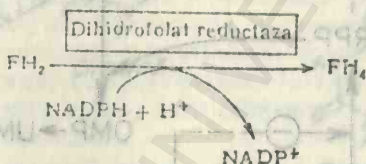




Timina, sub formă de TMP (dezoxiribotimidinmonofosfat) rezultă prin metilarea dUMP:



N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-Metilen-FH<sub>4</sub> furnizează gruparea C<sub>1</sub> și doi atomi de hidrogen necesari formării grupei —CH<sub>3</sub> și se transformă în dihidrofolat (FH<sub>2</sub>). Conversia FH<sub>2</sub> → FH<sub>4</sub>:



este obligatorie pentru refacerea fondului de unități C<sub>1</sub> active. Țesuturile în diviziune, unde are loc o sinteză rapidă de TMP sînt foarte sensibile la inhibiția dihidrofolat-reductazei. Mulți compuși cu această acțiune, unii analogi chimici ai acidului folic, sînt utilizați în chimioterapia cancerului.

**Reglarea sintezei de novo a nucleotidelor pirimidinice.** Sinteza de novo a nucleotidelor trebuie să asigure cantitatea și varietatea de nucleotide purinice și pirimidinice necesară sintezei acizilor nucleici. Pe lângă reglarea separată a biosintezei purinelor și pirimidinelor, funcționează și un control încrucișat între sinteza acestor două grupe de nucleotide. Principalele puncte de control sînt (fig. XI.11):

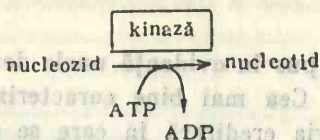
- inhibiția feed-back a aspartat transcarbamilazei de către nucleotidele pirimidinice, cel mai puternic inhibitor fiind CTP;
- nucleotidele cu uracil, precursor comun al celorlalte pirimidine, inhibă carbamil-fosfat-sintetaza; această enzimă este inhibată și de nucleotidele purinice;

- PRPP și PRPP sintetaza intervin ca factori reglatori și la sinteza de pirimidine, PRPP activează formarea carbamil-fosfatului iar nucleotidele pirimidinice (TDP) inhibă PRPP sintetaza.



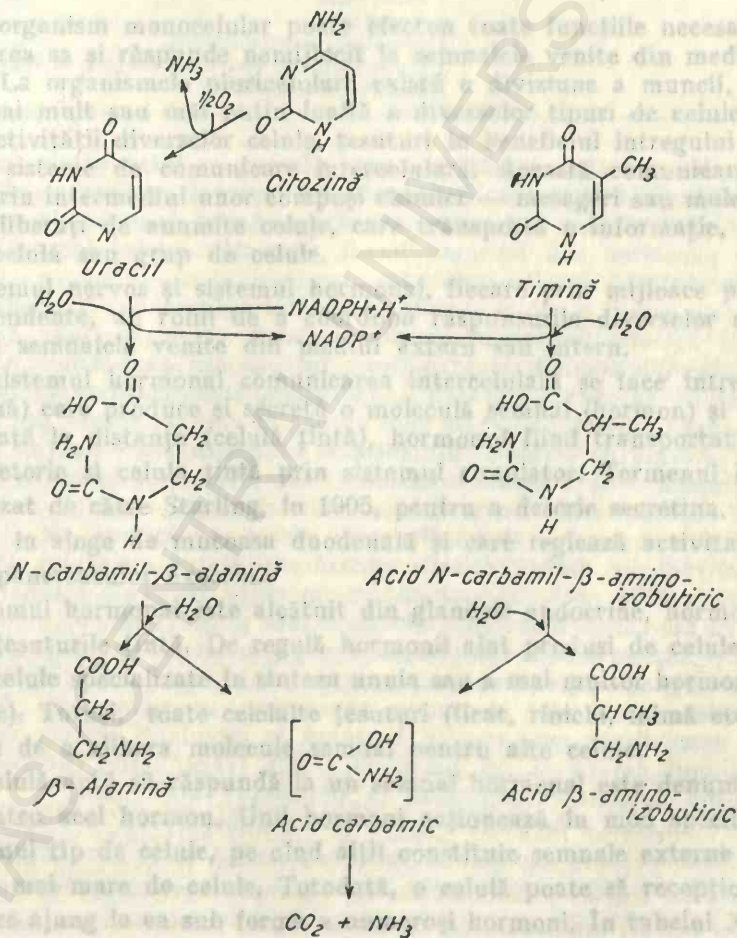


Nucleozidele pirimidinice sînt reciclate după fosforilare :



O kinază acceptă ca substrat uridina și citidina și o alta timidina. În cazul purinelor această cale metabolică este de mică importanță, singură adenzina putînd fi fosforilată la AMP.

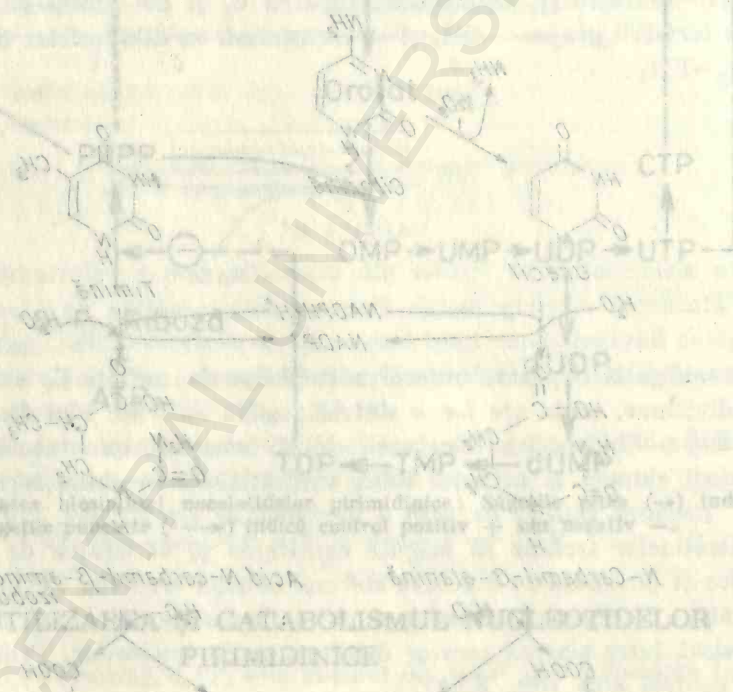
Bazele pirimidinice libere spre deosebire de cele purinice, nu mai sînt reutilizate ci degradate la compuși cu moleculă mică ( $\beta$ -alanină și acid  $\beta$ -aminoizobutiric) alături de  $\text{CO}_2$  și  $\text{NH}_3$  (fig. XI.12).  $\beta$ -Alanina și acidul  $\beta$ -aminoizobutiric sînt fie excretați ca atare, fie catabolizați pe căile oxidative terminale.



**Fig. XI.12 — Catabolismul bazelor pirimidinice.**

## XI.2.3. PATOLOGIA METABOLISMULUI. PIRIMIDINELOR

Cercetări recente au pus în evidență unele defecte metabolice ale metabolismului pirimidinelor. Cea mai bine caracterizată din punct de vedere biochimic este orotaciduria ereditară în care se excretă cantități mari de acid orotic și orotidină. Defectul metabolic este situat la nivelul complexului multienzimatic care utilizează acidul orotic ca substrat. Neputând sintetiza pirimidine bolnavii sînt dependenți de aportul exogen continuu al acestor compuși.



## XI.2.3. REUTILIZAREA ÎN CATABOLISMUL NUCLEOTIDELOR PIRIMIDINICE

Alături de nucleotidele pirimidice eliberate prin hidroliza de novo, formele metabolice ale nucleotidelor pirimidice sunt reutilizate în sinteza de nucleotizi. Astfel, nucleotizii pirimidici sunt reutilizați în sinteza de nucleotizi prin reacții similare cu cele descrise la purine.

Nucleotid purinice + Nucleotid pirimidice → Nucleotid pirimidice



Fig. XI.12 - Catabolismul nucleotidelor pirimidice.



## Cap. XII. SISTEMUL HORMONAL

### XII.1. GENERALITĂȚI

Un organism monocelular poate efectua toate funcțiile necesare pentru întreținerea sa și răspunde nemijlocit la semnalele venite din mediul înconjurător. La organisme pluricelulare există o diviziune a muncii, o specializare, mai mult sau mai puțin înaltă a diverselor tipuri de celule iar integrarea activității diverselor celule, țesuturi în beneficiul întregului organism necesită sisteme de comunicare intercelulară. Această comunicare se realizează prin intermediul unor compuși chimici — mesageri sau molecule semnal — eliberați de anumite celule, care transportă o informație, un mesaj la altă celulă sau grup de celule.

Sistemul nervos și sistemul hormonal, fiecare prin mijloace proprii dar interdependente, au rolul de a coordona răspunsurile diverselor celule, țesuturi la semnalele venite din mediul extern sau intern.

În sistemul hormonal comunicarea intercelulară se face între o celulă (endocrină) care produce și secretă o moleculă semnal (hormon) și o altă celulă situată la distanță (celulă țintă), hormonul fiind transportat între celula secretorie și celula țintă prin sistemul circulator. Termenul hormon a fost utilizat de către Starling, în 1905, pentru a descrie secretina, substanță eliberată în sânge de mucoasa duodenală și care reglează activitatea secretorie a pancreasului exocrin.

Sistemul hormonal este alcătuit din glandele endocrine, hormonii circulanți și țesuturile țintă. De regulă hormonii sunt produși de celule sau grupuri de celule specializate în sinteza unui sau a mai multor hormoni (glande endocrine). Totuși, toate celelalte țesuturi (ficat, rinichi, inimă etc.) au capacitatea de a elibera molecule semnal pentru alte celule.

O celulă aptă să răspundă la un semnal hormonal este denumită celulă țintă pentru acel hormon. Unii hormoni acționează în mod specific numai asupra unui tip de celule, pe când alții constituie semnale externe pentru o varietate mai mare de celule. Totodată, o celulă poate să recepționeze mesajele care ajung la ea sub forma a numeroși hormoni. În tabelul XII.1 sunt prezentate, principalele celule, glande endocrine și hormoni secretați.

## Principali hormoni și glandele (țesuturile) care îi produc

Glandă endocrină sau țesut	Hormon
Tiroidă	Tetraiodotironină ( $T_4$ ) și triiodotironină ( $T_3$ )
Paratiroidă	Parathormon
Medulosuprarrenală	Adrenalină
Testicul	Testosteronă
Ovar	Estradiol, progesteronă
Adenohipofiză	Hormon de creștere, prolactină, gonadotropine, tiro-tropină, corticotropină
Neurohipofiză	Vasopresină, oxitocină
Hipotalamus	Hormon eliberator (RH): TRH, CRH, Gn-RH Hormon inhibitor (RIH): GH-RIH
Pancreas	Insulină, glucagon
Creier	Neuropeptide diverse
Epifiză	Melatonină
Stomac	Gastrină
Intestin	Secretină, colecistokinină
Placentă	Gonadotropină corionică, hormon lactogen placentar
Înima	Peptide natriuretice

Comunicarea intercelulară se poate efectua și între celule învecinate. O celulă eliberează o moleculă semnal care reglează activitatea altor celule învecinate, fără a trece în torrentul circulator. Astfel de molecule semnal sînt denumite paracrine sau hormoni locali, respectiv modul lor reglator, acțiune paracrină.

În unele cazuri o celulă secretă în mediul extracelular o substanță care exercită o acțiune reglatoare asupra aceleiași celule (acțiune autocrină). Aceași moleculă semnal poate acționa într-un caz ca hormon propriu-zis și în altul ca substanță paracrină. De pildă, somatostatina acționează ca hormon asupra adenohipofizei (la care ajunge pe cale sanguină), pe cînd somatostatina produsă de celule D din insulele Langerhans are acțiune paracrină asupra celulelor A și B insulare inhibînd secreția de insulină și de glucagon.

Între sistemul endocrin și sistemul nervos există multiple întrepătrunderi. Secrețiile endocrine sînt influențate direct sau indirect de către creier și, în mod reciproc, hormonii influențează activitatea creierului. Pe de altă parte, terminațiile nervoase pot elibera în sînge molecule semnal care acționează ca adevărați hormoni. Substanța este produsă de către corpul neuronilor și printr-un curent axoplasmic ajunge în terminația axonală, este eliberată în sînge și acționează asupra unei celule situate la distanță. Astfel de molecule semnal sînt denumite neurocrine, neurohormoni. Structurile nervoase specializate care secretă hormoni în circulație servesc ca legături între sistemul nervos și cel hormonal, sînt transductori neuroendocrini, transformînd activitatea nervoasă în descărcare hormonală.

*Natură chimică a hormonilor* este variată (tabelul XII.2). Un număr mare dintre ei sînt peptide sau polipeptide, cuprinzînd între trei (TRH) pînă la cîteva sute de resturi aminoacidice. De exemplu hormonul de creștere cuprinde 178 resturi aminoacidice. În unele cazuri resturile terminale sau alte resturi aminoacidice sînt modificate prin prelucrări postraducționale.



## Clasificarea hormonilor după natura chimică

Hormoni peptidici	Hormonii steroidici	Hormonii derivați de la tirozină
Insulină	Cortisol (glucocorticoid)	Adrenalină
Glucagon	Aldosteronă	Noradrenalină
Parathormon	(mineralocorticoid)	Tetraiodotironină
Calcitonină	Estradiol	(tiroxină, $T_4$ )
Oxitocină	Estronă	Triiodotironină ( $T_3$ )
Vasopresină	Testosteronă	
Gonadotropine	$1,25-(OH)_2-D_3$	
Corticotropină (ACTH)		
Tireotropină (TSH)		
Prolactină (PRL)		
Factori de creștere		
(IGF, EGF, PDGF, NGF)		
Somatotropină		
Hormonii hipotalamici		
eliberatori (RH)		
Secretină		
Gastrină		
Colecistokinină		

Hormonii sexuali și corticosuprarenalieni au structură steroidică iar hormonul derivat de la vitamina D ( $1,25$ -dihidroxi- $D_3$ ) are o structură înrudită.

Un al treilea grup de hormoni, catecolaminele și hormonii tiroidieni, sînt derivați de la tirozină.

*Transportul hormonilor în sine.* Hormonii peptidici și catecolaminele, hidrosolubili, circulă în plasmă în stare liberă. Somatomedina (IGF) constituie o excepție, în plasmă este asociată cu o proteină transportoare specifică.

Hormonii steroidici, hormonii tiroidieni, vitamina D și formele sale active, sînt liposolubili și în plasmă sînt transportați de proteine specifice (hormone-binding protein). Hormonul liber este forma biologic activă, afinitatea și capacitatea proteinei de legare determinînd cantitatea de hormon liber. Proteinele de transport au specificitate înaltă pentru un hormon sau un grup de hormoni: TBG (thyroxine-binding globulin), CBG (cortisol-binding globulin), SHBG (sex hormone-binding globulin).

Serumalbumina are afinitate mică de legare pentru mulți hormoni liposolubili. Concentrația sa mare constituie o rezervă importantă de legare a hormonilor excedentari.

*Reglarea secrețiilor hormonale.* Secreția unui hormon suferă fluctuații în raport cu diverși factori. Eliberarea hormonului dintr-o celulă secretoare este controlată prin funcționarea unor mecanisme de retrocontrol. Majoritatea glandelor endocrine (tiroida, gonadele, cortexul adrenalilor) sînt controlate prin intermediul hipofizei anterioare care produce hormoni, tropine, cu funcție de reglare a activității glandei periferice. Nivelurile plasmatică ale hormonilor periferici variază în mod invers cu cele ale tropinelor hipofizare. Relațiile feed back între adenohipofiză și glandele endocrine aflate

sub controlul acestora se stabilesc atât direct, cât și prin intermediul hormonilor hipotalamici care stimulează eliberarea de tropine sau inhibă eliberarea acestora. Secreția hormonilor hipotalamici (RH — releasing hormone și RIH — release inhibiting hormone) este controlată prin feed back negativ atât de hormonul glandei periferice, cât și de tropina hipofizară. Hipotalamusul primește impulsuri pentru secreția hormonilor proprii din regiunile învecinate ale sistemului nervos central, realizându-se o interconectare neuroendocrină.

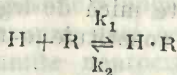
Activitatea secretorie a paratiroidiei, a pancreasului endocrin este reglată de parametrul biologic pe care îl controlează, glicemia și calcemia. Creșterea glicemiei declanșează eliberarea de insulină cu acțiune hipoglicemiantă. Parathormonul este eliberat ca răspuns la hipocalcemie, ca prin acțiunea sa hipercalcemiantă să redreseze calcemia.

### XII.1.1. RECEPTORII HORMONALI

Sensibilitatea unei celule la un mesaj hormonal este determinată de prezența în celulă, pe suprafață sau intracelular, a unui component capabil să recunoască hormonul, să îl fixeze și să inițieze evenimente care să constituie răspunsul celular specific la mesaj. Aceste substanțe capabile să recunoască și să lege un hormon sînt denumite receptori hormonali. Pentru hormonii hidrosolubili (polipeptide, catecolamine) receptorii se află în membrana celulară; receptorii hormonilor liposolubili (steroidici, tiroidieni) sînt situați intracelular.

Receptorii membranari sînt proteine integrale cu dimensiuni mai mari decît ale hormonilor. În general ei posedă un domeniu transmembrantar, altul extracelular și un domeniu intracelular. Sînt proteine alosterice care suferă tranziții conformaționale prin ocuparea situsurilor de legare a hormonului.

Interacțiunea hormon-receptor este asemănătoare interacțiunii unei enzime cu substratul ei, legarea hormonului la receptor făcîndu-se prin forțe slabe, necovalente, specificitatea interacțiunii fiind asigurată de complementaritatea sterică a hormonului și a situsului de legare de pe receptor. Legarea hormonului este reversibilă:



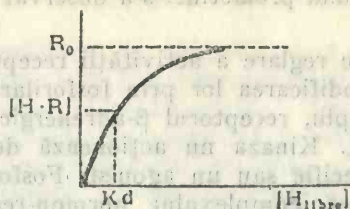
Constanta de disociere a complexului  $H \cdot R$ ,

$$K_d = \frac{k_2}{k_1} = \frac{[H][R]}{[H \cdot R]}$$

măsoară afinitatea receptorului pentru hormon. Cu cît valoarea acestei constante este mai mică cu atît afinitatea receptorului pentru hormon este mai mare.



Interacțiunea dintre hormon și receptor prezintă fenomenul de saturație:



Saturația corespunde ocupării tuturor situsurilor de legare de pe receptor:

$$[H \cdot R] = R_0$$

$R_0$  reprezintă numărul total de situsuri de legare, de receptor. Constanta de disociere ( $K_d$ ) corespunde concentrației hormonului la care sînt ocupate 50% din situsurile de legare.

Afinitățile receptorilor pentru hormoni trebuie să fie suficient de mari pentru a lega hormonul prezent în plasmă în concentrație foarte mică și, totodată, de a sesiza fluctuațiile foarte mici ale acestor concentrații. Pentru diverși hormoni constantele de afinitate ( $K_d$ ) au valori cuprinse între  $10^{-10}$  M și  $10^{-8}$  M și numărul de receptori per celulă este cuprinsă între 4 000—100 000.

Specificitatea receptorilor pentru hormoni este foarte înaltă, totuși, este posibil ca un receptor să lege și alte substanțe analoage. Un compus (altul decît hormonul specific) care se leagă la un receptor este denumit agonist. Un compus care se poate lega la receptor, dar legarea este neproductivă, nu inițiază un răspuns, este denumit antagonist.

Legarea unui hormon (sau agonist) la un receptor este urmată de un răspuns celular. Între gradul de ocupare a receptorilor și intensitatea răspunsului biologic există, în general, proporționalitate. În unele cazuri răspunsul maxim este obținut chiar atunci cînd numai o fracțiune din receptori sînt ocupați. Receptorii care sînt ocupați cînd concentrația hormonului crește peste nivelul necesar obținerii unui răspuns biologic maxim se numesc receptori de rezervă (spare receptor).

Receptorii hormonalî se află în stare dinamică, numărul de receptori este variabil în raport cu diverși factori. Nivelul hormonului specific în sînge poate regla numărul de receptori. O creștere a concentrației hormonului determină scăderea numărului de receptori (desensibilizarea țesutului sau „down regulation“). În unele cazuri s-a pus în evidență o creștere a numărului de receptori la o concentrație ridicată și susținută a hormonului („up regulation“).

Fenomenul de „down regulation“ este întîlnit la mulți hormoni ca insulină, glucagon, hormon de creștere. Se admite că scăderea numărului de receptori la o stimulare celulară prelungită are loc prin endocitoză complexelor hormon-receptor urmată de degradarea intracelulară a receptorului. Scăderea numărului de receptori reprezintă un mijloc de adaptare a răspun-

sului țesuturilor țintă la prezența unor concentrații hormonale mai mari decât cele normale. În cazul prolactinei s-a observat fenomenul de „up regulation”.

Un alt mecanism de reglare a activității receptorilor, a distribuției lor celulare, are la bază modificarea lor prin fosforilare sub acțiunea unor kinaze specifice. De exemplu, receptorul  $\beta$ -adrenergic este fosforilat de o kinază activată de AMP<sub>c</sub>. Kinaza nu acționează decât asupra receptorului ocupat cu hormonul specific sau un agonist. Fosforilarea receptorului este urmată de internalizarea complexului hormon-receptor. Capacitatea de răspuns a celei fațe de un agonist  $\beta$ -adrenergic este diminuată.

În cazul altor hormoni, insulină, factori de creștere (IGF-I, EGF, PDGF) receptorii sînt dotați cu activitate protein kinazică intrinsecă și, în același timp, sînt și substrat pentru aceste enzime. Prin autofosforilare receptorul își modelează propria sa activitate. Mai mult decât atât, activitatea protein kinazică a receptorului se manifestă și asupra altor proteine, membranare sau celulare, aceste fosforilări inițiind evenimente care duc la un răspuns biologic. Activitatea protein kinazică intrinsecă a receptorului insulinei, a receptorului EGF (epidermal growth factor) și a altor factori de creștere este tirozin-kinazică, fosforilează resturi tirozil din proteine.

Receptorii pentru hormonii liposolubili sînt localizați intracelular, în citoplasmă sau în nucleu. Hormonul difuzează liber prin membrană și în celulă interacționează cu receptorul specific. Complexul hormon-receptor interacționează cu situsuri acceptoare din cromatină și activează transcrierea ADN. Receptorii pentru estrogeni, progesteronă, cortisol sînt cel mai bine caracterizați. Sînt proteine ce cuprind cel puțin două situsuri, unul de legare a hormonului și altul prin care interacționează cu cromatina. După activarea transcrierii, complexul hormon-receptor se disociază, receptorul leagă o nouă moleculă de hormon. Steroidul, probabil într-o formă modificată, difuzează din celulă.

## XII.1.2. MECANISMELE GENERALE DE ACȚIUNE A HORMONILOR

Funcțiile reglatoare ale hormonilor se exercită prin modificarea vitezei unor procese metabolice din țesuturile țintă. Ei acționează de regulă asupra etapelor limitante de viteză (pace-maker) pentru procesul dat. Reglarea hormonală se realizează prin modificări, modulări ale activității unor proteine (proteine de transport, proteine contractile, canale ionice, enzime etc.) sau prin variații cantitative ale unor astfel de proteine.

Cele două clase de hormoni, liposolubili și hidrosolubili, acționează prin mecanisme diferite.



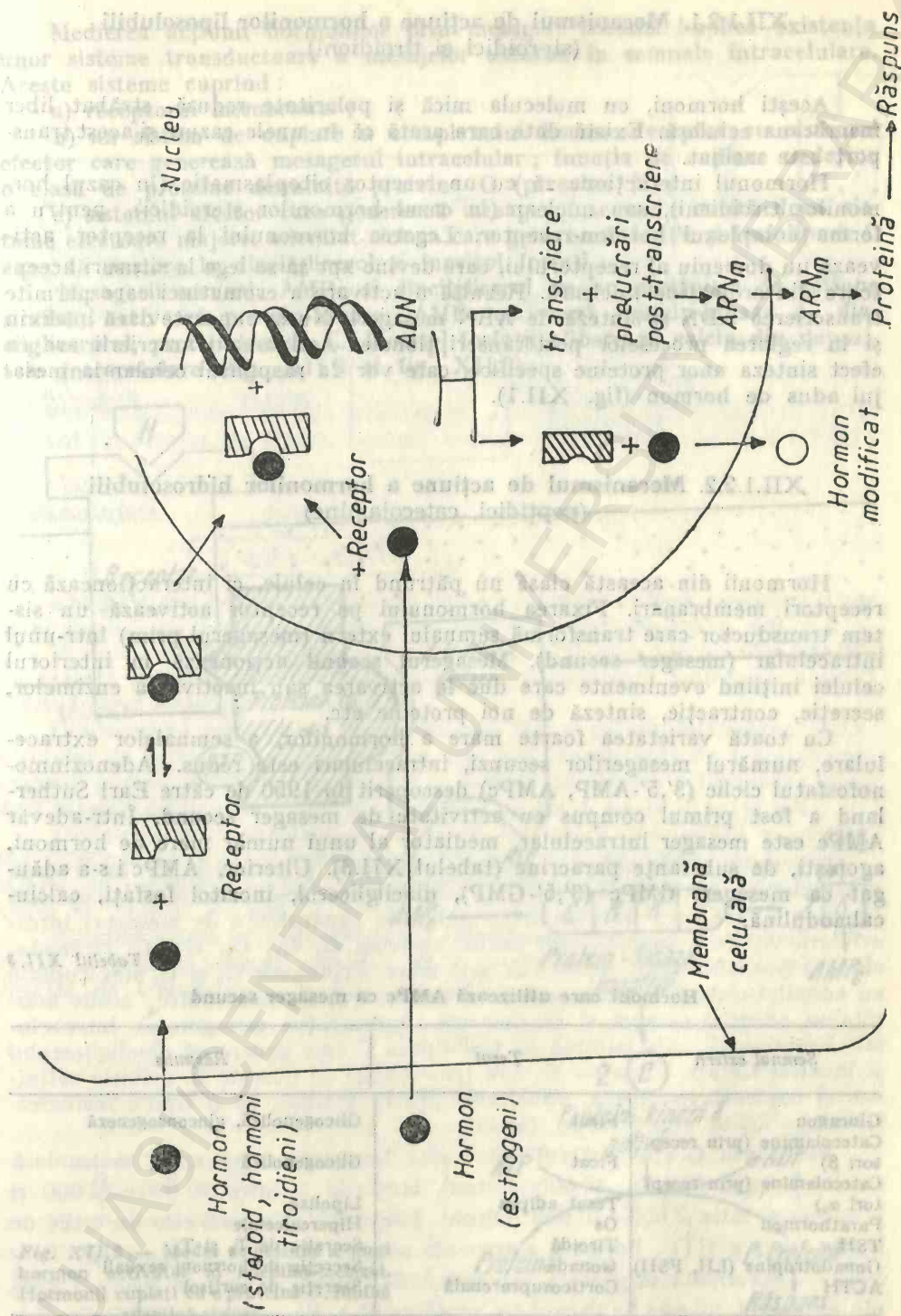


Fig. XII.1 — Mecanismul de acțiune a hormonilor steroidici și tiroidieni.

### XII.1.2.1. Mecanismul de acțiune a hormonilor liposolubili (steroidici și tiroidieni)

Acești hormoni, cu molecula mică și polaritate redusă, străbat liber membrana celulară. Există date care arată că în unele cazuri și acest transport este mediat.

Hormonul interacționează cu un receptor citoplasmatic (în cazul hormonilor tiroidieni), sau nuclear (în cazul hormonilor steroidici), pentru a forma complexul hormon-receptor. Legarea hormonului la receptor activează un domeniu al receptorului, care devine apt să se lege la situsuri acceptoare din cromatina nucleară. Rezultă o activare a cromatinei care permite transcrierea ADN și sinteza de ARN mesageri. Nu se cunoaște dacă intervin și în reglarea proceselor postranscripționale. Activarea transcrierii are ca efect sinteza unor proteine specifice, care vor da răspunsul celular la mesajul adus de hormon (fig. XII.1).

### XII.1.2.2. Mecanismul de acțiune a hormonilor hidrosolubili (peptidici, catecolamine)

Hormonii din această clasă nu pătrund în celule, ci interacționează cu receptori membranari. Fixarea hormonului pe receptor activează un sistem transductor care transformă semnalul extern (mesagerul prim) într-unul intracelular (mesager secund). Mesagerul secund acționează în interiorul celulei inițiind evenimente care duc la activarea sau inactivarea enzimelor, secreție, contracție, sinteză de noi proteine etc.

Cu toată varietatea foarte mare a hormonilor, a semnalelor extracelulare, numărul mesagerilor secunzi, intracelulari este redus. Adenozinmonofosfatul ciclic ( $3',5'$ -AMP, AMPc) descoperit în 1950 de către Earl Sutherland a fost primul compus cu activitate de mesager secund. Într-adevăr AMPc este mesager intracelular, mediator al unui număr mare de hormoni, agonști, de substanțe paracrine (tabelul XII.3). Ulterior, AMPc i s-a adăugat ca mesageri GMPc ( $3',5'$ -GMP), diacilglicerol, inozitol fosfați, calciocalmodulină.

Tabelul XII.3

Hormoni care utilizează AMPc ca mesager secund

Semnal extern	Țesut	Răspuns
Glucagon	Ficat	Glicogenoliză, gluconeogeneză
Catecolamine (prin receptori $\beta$ )	Ficat	Glicogenoliză
Catecolamine (prin receptori $\alpha_2$ )	Tesut adipos	Lipoliză
Parathormon	Os	Hipercalcemie
TSH	Tiroidă	Secreție de $T_4$ și $T_3$
Gonadotropine (LH, FSH)	Gonade	Secreție de hormoni sexuali
ACTH	Corticosuprarenală	Secreție de cortisol



Medierea acțiunii hormonilor prin mesageri secunzi implică existența unor sisteme transductoare a mesajelor externe în semnale intracelulare. Aceste sisteme cuprind:

- a) receptorul membranar;
- b) un sistem de cuplare a complexului hormon-receptor cu sistemul efector care generează mesagerul intracelular; funcția de cuplare o deține o clasă de proteine denumite proteine G (proteine N);
- c) sistemul efector care generează mesagerul secund; există două sisteme efectoare majore, adenilat-ciclaza care generează AMPc și fosfolipaza C care dă naștere la diacilglicerol și inozitol fosfați.

Mesagerii secunzi, AMPc și diacilglicerol au un mecanism de acțiune similar, activează protein-kinaze, AMPc activează protein-kinaza A, diacilglicerolul, protein-kinaza C. Inozitol fosfații eliberează calciu din depozitele intracelulare (fig. XII.2 și fig. XII.3).

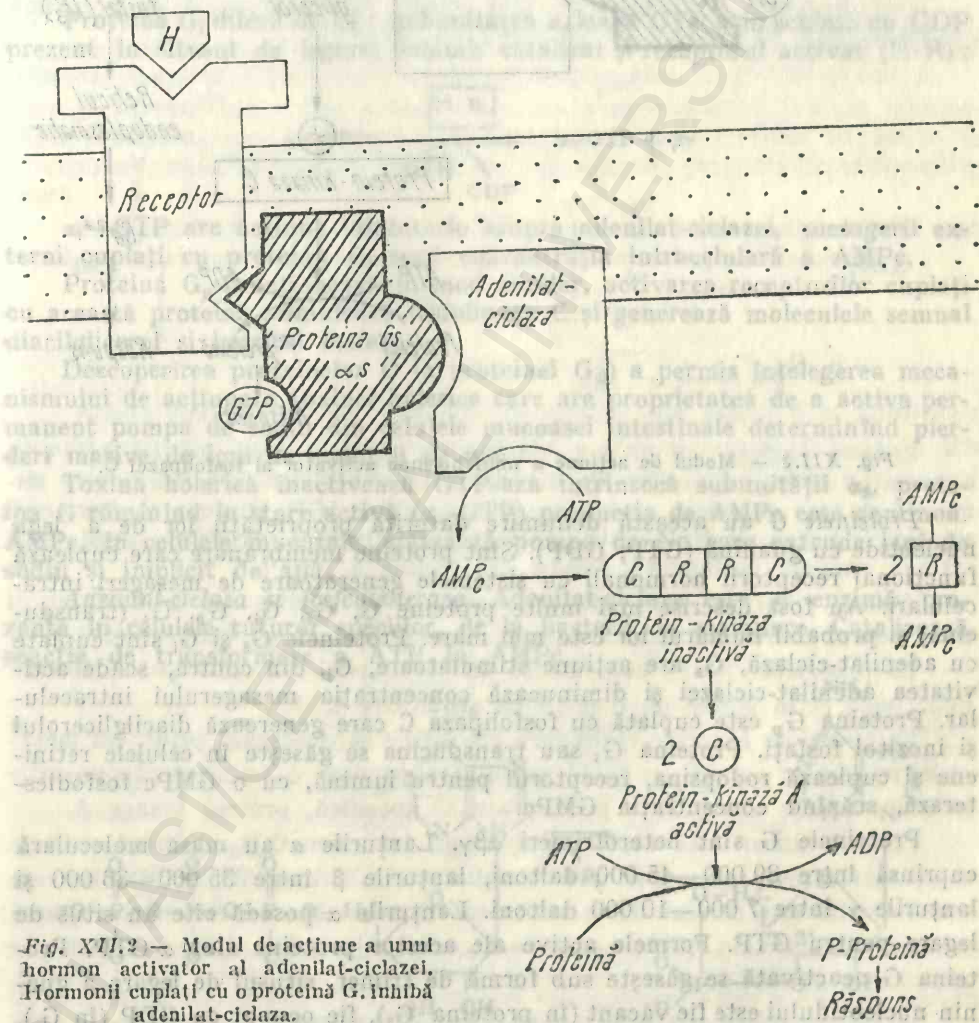


Fig. XII.2 — Modul de acțiune a unui hormon activator al adenilat-ciclazei. Hormonii cuplați cu o proteină G, inhibă adenilat-ciclaza.

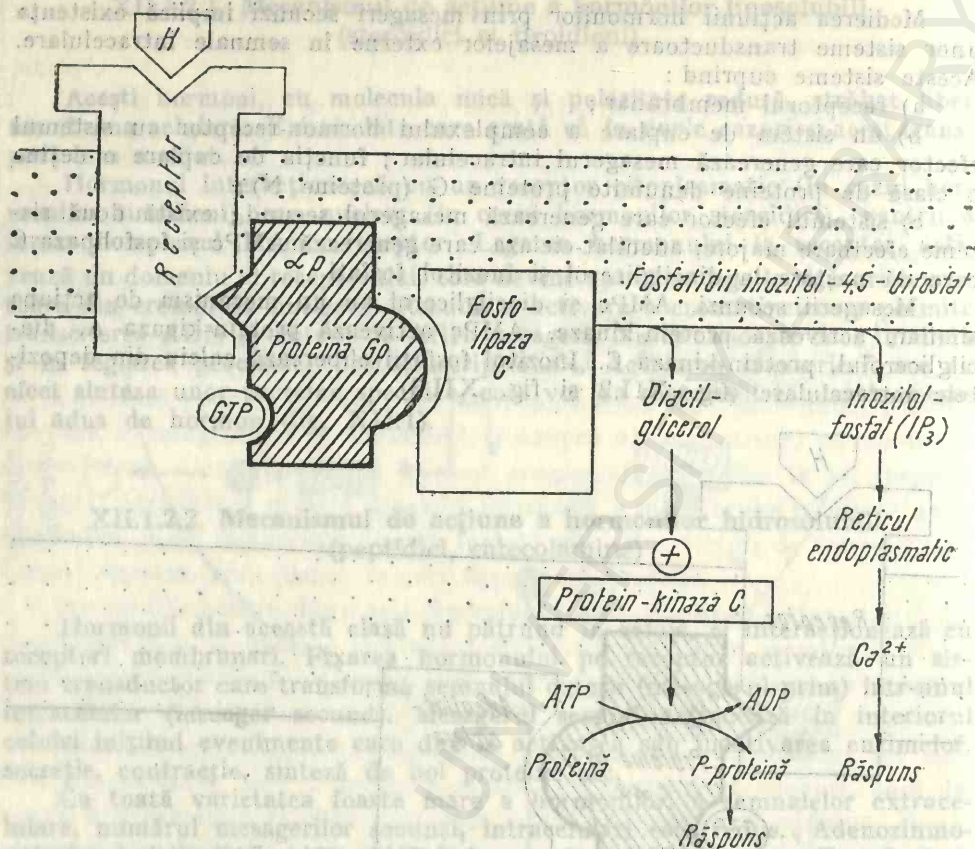


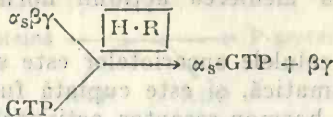
Fig. XII.3 — Modul de acțiune a unui hormon activator al fosfolipazei C.

Proteinele G au această denumire datorită proprietății lor de a lega nucleotide cu guanină (GTP, GDP). Sînt proteine membranare care cuplează funcțional receptorii hormionali cu sistemele generatoare de mesageri intracelulari. Au fost descrise mai multe proteine G,  $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_p$ ,  $G_t$  (transducină) și probabil numărul lor este mai mare. Proteinele  $G_s$  și  $G_i$  sînt cuplate cu adenilat-ciclază,  $G_s$  are acțiune stimulatorie,  $G_i$ , din contră, scade activitatea adenilat-ciclazei și diminuează concentrația mesagerului intracelular. Proteina  $G_p$  este cuplată cu fosfolipaza C care generează diacilglicerolul și inozitol fosfați. Proteina G, sau transducina se găsește în celulele retiniene și cuplează rodopsina, receptorul pentru lumină, cu o GMPc fosfodiesterază, scăzînd concentrația GMPc.

Proteinele G sînt heterotrimeri  $\alpha\beta\gamma$ . Lanțurile  $\alpha$  au masa moleculară cuprinsă între 39 000—45 000 daltoni, lanțurile  $\beta$  între 35 000—36 000 și lanțurile  $\gamma$  între 7 000—10 000 daltoni. Lanțurile  $\alpha$  posedă cite un situs de legare pentru GTP. Formele active ale acestor proteine sînt  $\alpha$ -GTP. Proteina G neactivată se găsește sub formă de trimer, situsul de legare a guanin nucleotidului este fie vacant (în proteina  $G_s$ ), fie ocupat cu GDP (în  $G_i$ ).

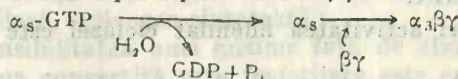


Fixarea hormonului pe un receptor cuplat cu proteina  $G_s$  determină legarea GTP de lanțul  $\alpha$  și, simultan are loc disocierea trimerului:

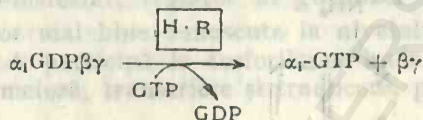


Complexul  $\alpha_s$ -GTP activează adenilat-ciclaza care transformă ATP în AMPe, concentrația mesagerului secund crește.

Starea activă a proteinei G ( $\alpha$ -GTP) este de scurtă durată, subunitatea  $\alpha$  are activitate hidrolitică, intrinsecă (GTPază) și hidrolizează GTP. Subunitatea  $\alpha$  se asociază apoi spontan cu  $\beta\gamma$ :



Proteina  $G_i$  diferă de  $G_s$ : subunitatea  $\alpha_i$  leagă GTP prin schimb cu GDP prezent în situsul de legare, schimb catalizat și receptorul activat ( $H \cdot R$ ):



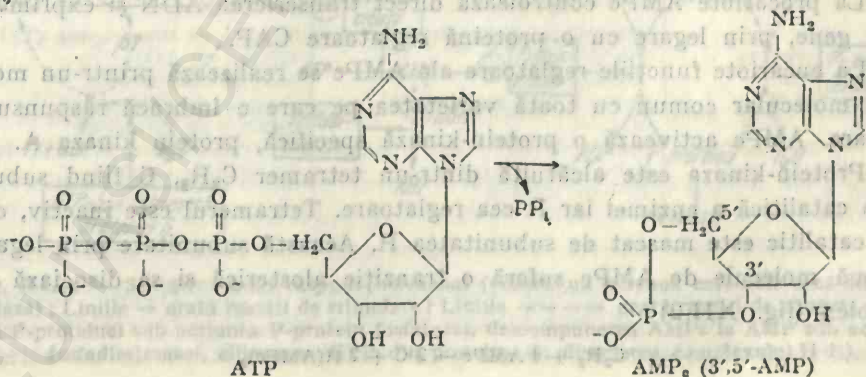
$\alpha_i$ -GTP are acțiune inhibitorie asupra adenilat-ciclazei, mesagerii externi cuplați cu proteina  $G_i$  scad concentrația intracelulară a AMPe.

Proteina  $G_p$  funcționează în mod similar, activarea receptorilor cuplați cu această proteină stimulează fosfolipaza C și generează moleculele semnal diacilglicerol și inozitol fosfați.

Descoperirea proteinelor G (a proteinei  $G_s$ ) a permis înțelegerea mecanismului de acțiune a toxinei holerice care are proprietatea de a activa permanent pompa de sodiu din celulele mucoasei intestinale determinând pierderi masive de ioni de sodiu și de apă.

Toxina holerică inactivează GTP-aza intrinsecă subunității  $\alpha_s$ , proteina G rămânând în stare activă ( $\alpha_s$ -GTP) producția de AMPe este continuă. AMPe, în celulele mucozale, activează pompa de Na care extrude ioni de sodiu și implicit de apă.

**Adenilat-ciclaza și fosfodiesteraza.** Adenilat-ciclaza este o enzimă prezentă în celulele tuturor speciilor, de la bacterii, la mamifere. Catalizează reacția de transformare a ATP în AMPe.

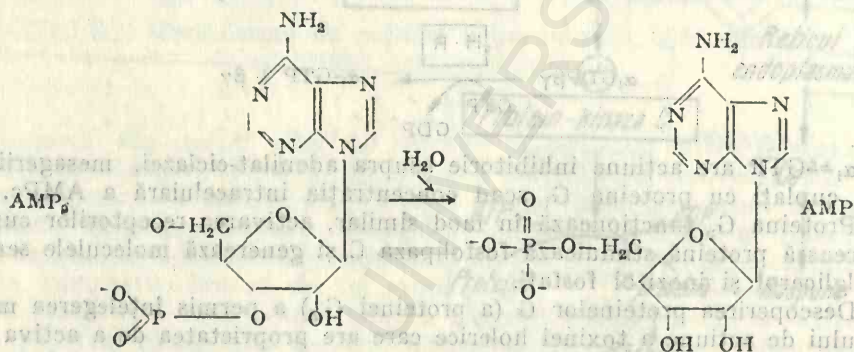


Descoperirea acestei enzime de către Sutherland a stat la baza formulării conceptului privind medierea acțiunii hormonilor printr-un mesager secund intracelular.

Adenilat-ciclaza în celulele eucariotelor este situată în membrana plasmatică, pe fața citoplasmatică, și este cuplată funcțional cu o proteină G,  $G_s$  sau  $G_i$ . Complexele hormon-receptor activează proteina G prin formarea de  $\alpha$ -GTP. Cei mai mulți hormoni sînt cuplați cu proteina  $G_s$  cu acțiune stimulatorie asupra adenilat-ciclazei și determină creșterea concentrației intracelulare a AMPc. Alți mesageri externi (somatostalină, angiotensină II) sînt cuplați cu proteina  $G_i$  și determină inhibarea adenilat-ciclazei și scăderea concentrației AMPc.

În unele țesuturi activitatea adenilat ciclazei este influențată de ioni de calciu.

**Fosfodiesteraza.** AMPc are o viață scurtă, este descompus de o enzimă citoplasmatică, ubicuitară, AMPc fosfodiesteraza :



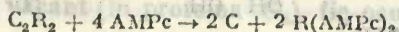
Această enzimă are un rol deosebit în reglarea concentrației AMPc și activitatea ei este modulată de diverși factori. Activitatea enzimei este stimulată de ioni de calciu, prostaglandine, insulină, IGF. Din contră, hormonii steroidici, hormonii tiroidieni, metilxantinele (cafeina, teofilina) scad activitatea enzimei prelungind durata de acțiune a AMPc.

**Rolurile AMPc.** Acest nucleotid ciclic este mediatorul intracelular al unui număr mare de semnale externe, hormoni, agonști (tabelul XII.3).

La procariote AMPc controlează direct transcrierea ADN și exprimarea unor gene, prin legare cu o proteină reglatoare CAP.

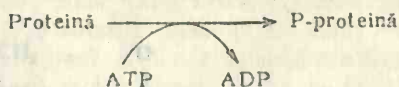
La eucariote funcțiile reglatoare ale AMPc se realizează printr-un mecanism molecular comun cu toată varietatea pe care o îmbracă răspunsurile celulare. AMPc activează o protein-kinază specifică, protein kinaza A.

Protein-kinaza este alcătuită dintr-un tetramer  $C_2R_2$ , C fiind subunitatea catalitică a enzimei iar R cea reglatoare. Tetramerul este inactiv, centrul catalitic este mascat de subunitatea R. Această subunitate prin legarea a două molecule de AMPc suferă o tranziție alosterică și se disociază din complex (fig. XII.2):





Subunitățile C eliberate își manifestă puterea catalitică :



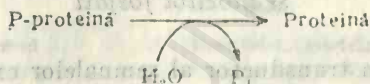
Proteinele fosforilate de această enzimă sînt numeroase și varietatea răspunsurilor mediate de AMPc este foarte mare, depinzînd de natura substratului, a celulei stimulate și a programului ei genetic.

Fosforilarea afectează activitatea proteinelor în moduri foarte variate :

- mărește sau micșorează activitatea catalitică a unei enzime (de exemplu glicogen-fosforilază, glicogen-sintetază);
- modifică sensibilitatea unei enzime față de efectori;
- dacă proteina convertită prin fosforilare este ea însăși o kinază are loc o amplificare în cascadă a semnalului inițial (de ex. fosforilaz-kinaza);
- fosforilarea poate modifica concentrația unor metaboliți reglatori (de ex. fructozo-2,6-bisfosfat, reglator al glicolizei și gluconeogenezei).

În afara rolurilor mai bine cunoscute la nivelul unor procese metabolice, protein-kinaza A participă la fosforilarea unor proteine implicate în diviziunea celulară, meioză, transcriere și traducere, permeabilitate membranară.

*Fosfoprotein-fosfataze.* Proteinele fosforilate de către proteinkinaze sînt readuse la starea anterioară sub acțiunea unor fosfoprotein-fosfataze :



Aceste enzime nu sînt prea bine cunoscute, dar există deja numeroase dovezi că activitatea lor este controlată de diverși factori (hormoni). Ele au rolul de a stinge răspunsul la semnalul extern (fig. XII.4).

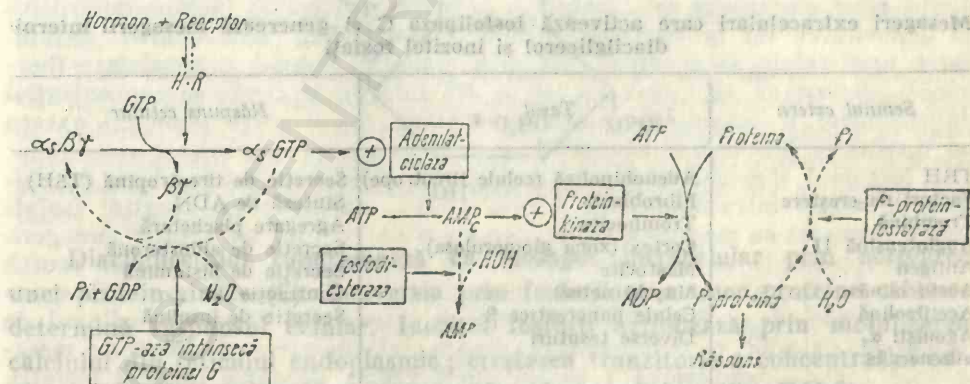
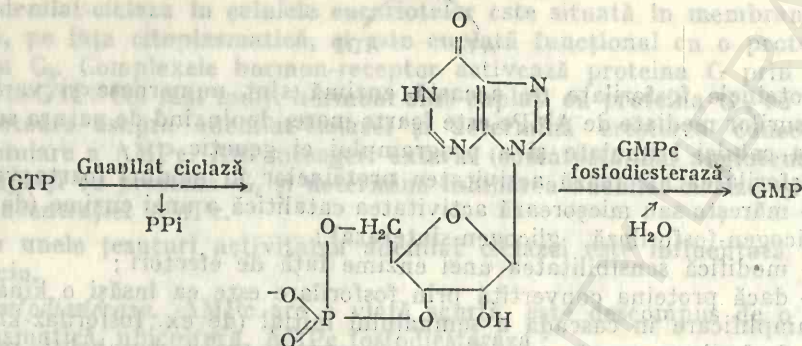


Fig. XII.4 — Stingerea unui răspuns hormonal (pentru un hormon care activează adenilat-ciclaza); Linile — arată reacții de stimulare; Linile — arată reacții de stingere (hidroliza P-proteinei sub acțiunea P-protein fosfatazei, descompunerea AMPc la AMP sub acțiunea fosfodiesterazei, eliberarea GTP din proteina G, disocierea complexului H-R).

**GMPC.** Acest compus este similar cu AMPc. Se formează din GTP printr-o reacție catalizată de guanilat-ciclază și este descompus de o GMPC fosfodiesterază :



Rolurile GMPC de mesager intracelular par a fi mult mai restrinse decât cele ale AMPc. Existența unei protein-kinaze activată de acest nucleotid este incertă. GMPC mediază răspunsul celulelor fotosensibile (bastonașe) din retină, este considerat mesagerul secund al peptidelor natriuretice.

### *Fosfolipaza C și mesagerii intracelulari diacilglicerol și inozitol fosfați*

Un al doilea sistem transductor al semnalelor externe în mesageri intracelulari este alcătuit din fosfolipaza C care acționează asupra fosfolipidelor membranare și generează diacilglicerol și inozitol-fosfați. Acest sistem este utilizat de diverse celule pentru a media răspunsuri la variate semnale externe (tabelul XII.4).

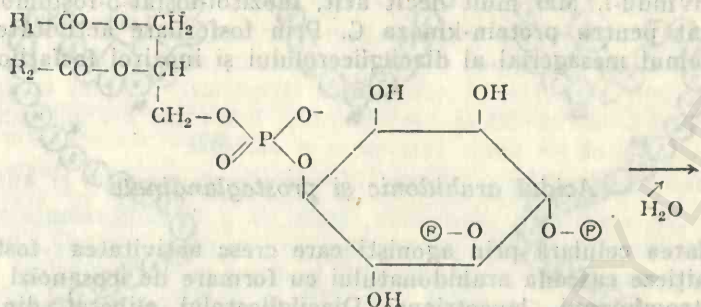
*Tabelul XII.4*

**Mesageri extracelulari care activează fosfolipaza C și generează mesagerii interni diacilglicerol și inozitol fosfați**

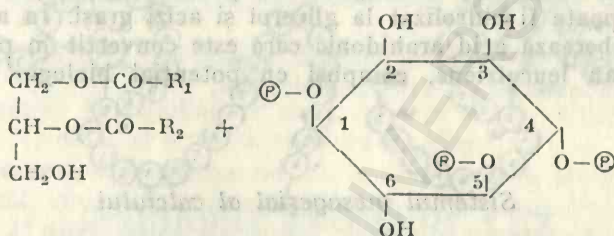
Semnal extern	Țesut	Răspuns celular
TRH Factori de creștere Trombină Angiotensină II Antigen Acetilcolină Acetilcolină Agoniști $\alpha_1$ adrenergici	Adenohipofiză (celule tireotrope) Fibroblaști Trombocite Cortex (zona glomerulosa) Mastocite Mușchi netezi Celule pancreatice $\beta$ Diverse țesuturi	Secreție de tireotropină (TSH) Sinteză de ADN Agregare plachetară Secreție de aldosteronă Secreție de histamină Contractie Secreție de insulină

Fosfolipaza C este o enzimă care hidrolizează în mod specific, fosfoinozotide (fosfatidil inozitoli) membranare. Enzima este cuplată cu o proteină din familia G (Gp) și este activată prin stimularea celulară cu un hormon



$$\begin{array}{l} R_1-CO-O-CH_2 \\ R_2-CO-O-CH \end{array}$$


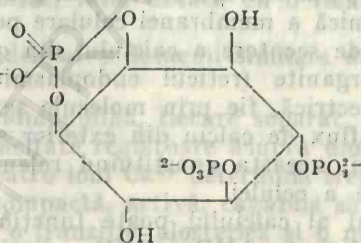
Fosfatidil-Inozitol-4,5-bis fosfat



### Diacilglycerol

Inozitol-1,4,5-trisfosfat

Alături de inozitol-1,4,5-trisfosfat se formează și un compus ciclic, inozitol-1:2,4,5-trisfosfat :



Diacylglicerolul funcționează ca mesager intracelular prin activarea unei protein-kinaze (C). Conversia prin fosforilare a unor proteine celulare determină răspunsul celular. Inozitol fosfații acționează prin mobilizarea calciului din reticulul endoplasmic; creșterea tranzitorie a concentrației calciului citosolic mediază mai departe alte efecte celulare (fig. XII.3).

Răspunsul celular la stimulii externi se stinge prin reciclarea mesagerilor intracelulari. Diacilglicerolul și inozitol fosfații sint reutilizați pentru sinteză de fosfolipide membranare.

Un rol deosebit în acest proces de stingere a răspunsului îl are o enzimă recent descoperită, inozitol-fosfat-5-fosfomonoesteraza, care îndepărtează un rest fosfat din inozitol-1,4,5-trisfosfat sau inozitol-1:2,4,5-trisfosfat ciclic inactivându-i. Mai mult decât atât, inozitol-fosfat-5-fosfomonoesteraza este substrat pentru protein-kinaza C. Prin fosforilare activitatea enzimei crește. Sistemul mesagerial al diacilglicerolului și inozitol fosfaților se autoreglează.

### *Acidul arahidonic și prostaglandinele*

Stimularea celulară prin agonisti care cresc activitatea fosfolipazei C poate să inițieze cascada arahidonatului cu formare de icosanoizi — prostaglandine, tromboxani, leucotriene. Diacilglicerolul eliberat din fosfolipidele membranare sub acțiunea fosfolipazei C, cuprinde în poziția 2, de regulă, un rest de acid arahidonic. Diacilglicerolul poate fi reincorporat ca atare în fosfolide sau poate fi hidrolizat la glicerol și acizi grași. În această ultimă situație, se eliberează acid arahidonic care este convertit în prostaglandine, tromboxani sau leucotriene, compuși cu potențial biologic foarte ridicat (cap. VIII).

### *Sistemul mesagerial al calciului*

Calciul este un mesager intracelular în diverse tipuri de celule. El reglează contractia tuturor formelor de mușchi, secreția produselor exocrine, endocrine, neurocrine, proliferarea celulară și numeroase alte procese metabolice.

Concentrația intracelulară a calciului este foarte mică, de 1 000—10 000 ori mai mică decât în fluidul extracelular. Acest gradient este menținut prin permeabilitatea foarte mică a membranei celulare pentru calciu și prin existența unor mecanisme de scoatere a calciului din celulă (pompe de calciu) și depozitarea lui în organite (reticul endoplasmic, mitocondrii). Stimularea unei celule, fie electrică, fie prin molecule semnal extracelulare (hormoni), determină un influx de calciu din exterior și creșterea concentrației intracelulare a calciului, aceasta constituind releul între semnalul extern și mașinăria biochimică a celulei.

Sistemul mesagerial al calciului poate funcționa independent de ceilalți mesageri intracelulari ca AMPc, GMPc, diacilglicerol, inozitol fosfați sau este cuplat cu mecanismele de formare și de acțiune ale acestor mesageri.

Răspunsurile mediate de calciu sînt unele foarte rapide și de scurtă durată, pe cînd altele se instalează mai încet dar durează mai mult. Răspunsurile rapide (de ordinul milisecundelor) sînt mediate direct de influxul de calciu din exterior, pe cînd acelea susținute sînt cuplate cu alte sisteme mesageriale (de ex.: eliberarea calciului din organite de către inozitol fosfați).

**Calmodulina.** Rolurile reglatoare ale calciului sînt mediate de o proteină denumită calmodulină. Aceasta este prezentă în toate celulele eucariotelor și are, pe de o parte, proprietatea de a lega ionii de calciu și, pe de altă parte, de a regla activitatea unei alte proteine.



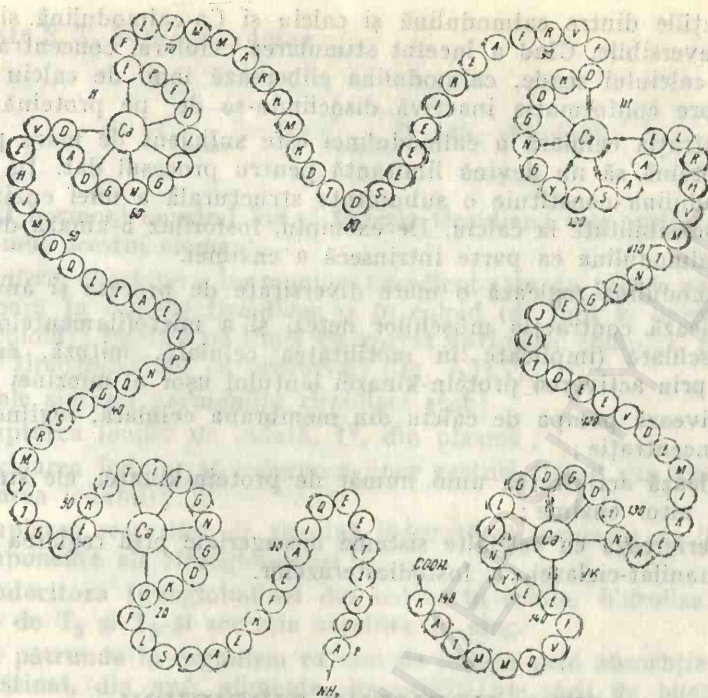


Fig. XII.5 — Calmodulina; A-Ala; D-Asp; E-Glu; F-Phe; G-Gly; H-His; I-Ile; J-trimetil-Lys; K-Lys; L-Leu; M-Met; N-Asn; P-Pro; Q-Glu; R-Arg; S-Ser; T-Tre; V-Val; Y-Tyr.

Calmodulina este alcătuită dintr-un lanț polipeptidic cu 148 resturi aminoacidice. Conține numeroase resturi de aspartil și glutamil. Nu cuprinde cisteină și punți disulfurice, fiind dotată cu o flexibilitate conformațională foarte mare.

Calmodulina cuprinde patru domenii similare de legare a calciului (fig. XII.5).

Ionii de calciu și calmodulina, fiecare separat, sînt inactivi. Complexul Ca-calmodulină are capacitate reglatoare asupra unei diversități foarte mari de proteine. Fixarea a patru ioni  $\text{Ca}^{2+}$  determină trecerea calmodulinei într-o nouă conformație mai compactă, activă, capabilă să interacționeze cu o altă proteină în care induce o tranziție alosterică și o modificare a funcției proteinei (fig. XII.6).

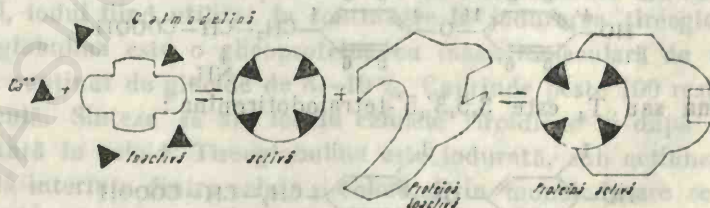


Fig. XII.6 — Activarea unei proteine de către Ca-calmodulină.

Interacțiunile dintre calmodulină și calciu și Ca-calmodulină și proteină sînt ușor reversibile. Cînd a încetat stimularea celulară, concentrația intracelulară a calciului scade, calmodulina eliberează ionii de calciu și suferă tranziția spre conformația inactivă disociindu-se de pe proteină.

Concentrația celulară a calmodulinei este suficient de mare pentru ca această proteină să nu devină limitantă pentru procesul dat. În unele cazuri, calmodulina constituie o subunitate structurală a unei enzime căreia îi conferă sensibilitate la calciu. De exemplu, fosforilaz b-kinaza din mușchi cuprinde calmodulina ca parte intrinsecă a enzimei.

Ca-calmodulina reglează o mare diversitate de procese și anume :

- reglează contracția mușchilor netezi și a microfilamentelor din celule nemusculare (implicate în motilitatea celulară, mitoză, endocitoză, exocitoză) prin activarea protein-kinazei lanțului ușor al miozinei (MLCK);
- activează pompa de calciu din membrana celulară, reglîndu-și propria sa concentrație;
- reglează activitatea unui număr de protein-kinaze, ele singure modulatori ai altor enzime;
- interferează cu celelalte sisteme mesageriale prin reglarea adenilat-ciclazei, guanilat-ciclazei, a fosfodiesterazelor.

## XII.2. HORMONII TIROIDIENI

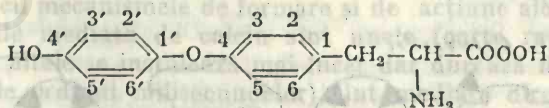
Glanda tiroidă produce doi hormoni, tetraiodotironina ( $T_4$  sau tiroxina) și triiodotironina ( $T_3$ ), care reglează procesele metabolice fundamentale ale tuturor țesuturilor și sînt esențiali pentru viață.

Glanda tiroidă este așezată în partea anterioară a gîtului, este alcătuită din doi lobi uniți printr-un istm. La adult cîntărește aproximativ 20 g.

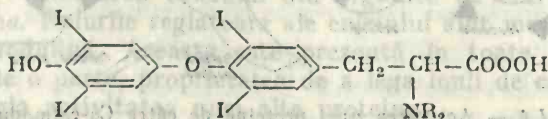
Unitățile funcționale ale tiroidei sînt foliculii tiroidieni alcătuiți dintr-un strat de celule epiteliale care delimitează un miez gelatinos, omogen, denumit coloid. Acest coloid constă dintr-o soluție concentrată de tireoglobulină.

Foliculii tiroidieni au o rețea capilară bogată.

**Struktură.** Hormonii tiroidieni sînt derivați iodurați ai unui compus ipotetic, derivat de la tirozină, tironina :

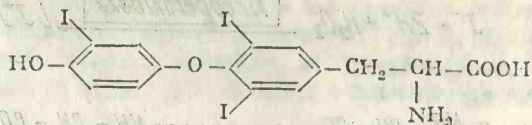


Tiroxina sau  $T_4$  este 3,5,3',5'-tetraiodotironina :





$T_3$  este 3, 3', 5-triiodotironina :



Acești hormoni cuprind iod și funcția tiroidiană este intim corelată cu metabolismul acestui element.

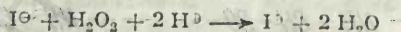
**Biosinteză.** Biosinteza hormonilor tiroidieni este un proces complex care se desfășoară în celulele tiroidiene și în coloid (de fapt la interfața dintre celule și coloid); implică pe lângă un aparat enzimatic complex, participarea iodului și tireoglobulinei ca precursori (fig. XII.7).

Etapile sintezei hormonilor tiroidieni sînt :

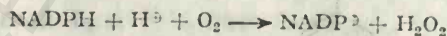
- captarea ionilor de iodură,  $\text{I}^-$ , din plasmă ;
- oxidarea iodului și iodurarea unor resturi tirozil din tireoglobulină (organificarea iodului);
- cuplarea resturilor de tirozină iodurată și formarea de  $T_3$  și  $T_4$  ca părți componente ale tireoglobulinei ;
- endocitoza tireoglobulinei din coloid în celule, hidroliza proteinei, eliberarea de  $T_3$  și  $T_4$  și secreția acestora în sînge.

Iodul pătrunde în organism ca ioni de iodură prin absorbție în tractul gastrointestinal, din apă, alimente, impurități ale sării de bucătărie. Din plasmă, ionii  $\text{I}^-$  sînt captați de tiroidă printr-un proces activ, dependent de ATP (pompa de iod). O cantitate mică de iodură traversează membrana celulară reversibil, prin difuzie. Prin transport activ tiroida este aptă să realizeze o concentrare a iodului care, în deficiență de iod, poate să fie de 40—50 ori nivelul plasmatic al iodului. Captarea iodului în tiroidă este inhibată de ioni ca perclorat ( $\text{ClO}_4^-$ ), pertehnetat ( $\text{ThO}_4^-$ ), tiocianat ( $\text{SCN}^-$ ), competitori ai iodului pentru mecanismul de transport. Această inhibiție este utilizată în unele procedee de explorare a funcției tiroidiene.

Oxidarea iodului are loc pe suprafața apicală a celulelor tiroidiene unde este localizată tireoperoxidaza care catalizează reacția :



Peroxidul de hidrogen se formează intracelular sub acțiunea unei oxidaze NADPH (NADH) dependente :



Forma oxidată a iodului, probabil  $\text{I}^+$ , nu este eliberată din centrul activ al enzimei, iodul fiind utilizat în continuare la iodurarea tireoglobulinei.

Tireoglobulina este o glicoproteină cu masa moleculară de 660 Kdaltoni și un conținut de glucide de 8—10%. Cuprinde peste 100 resturi tirozil per moleculă. Sinteza sa are loc în celulele tiroidiene și după glicolizare este secretată în coloid. Tireoglobulina este iodurată, sub acțiunea tireoperoxidazei, la interfața dintre celule și coloid. Prin monoiodurare se formează resturi de monoiodotirozină (MIT) și prin diiodurare resturi de diiodotirozină (DIT).

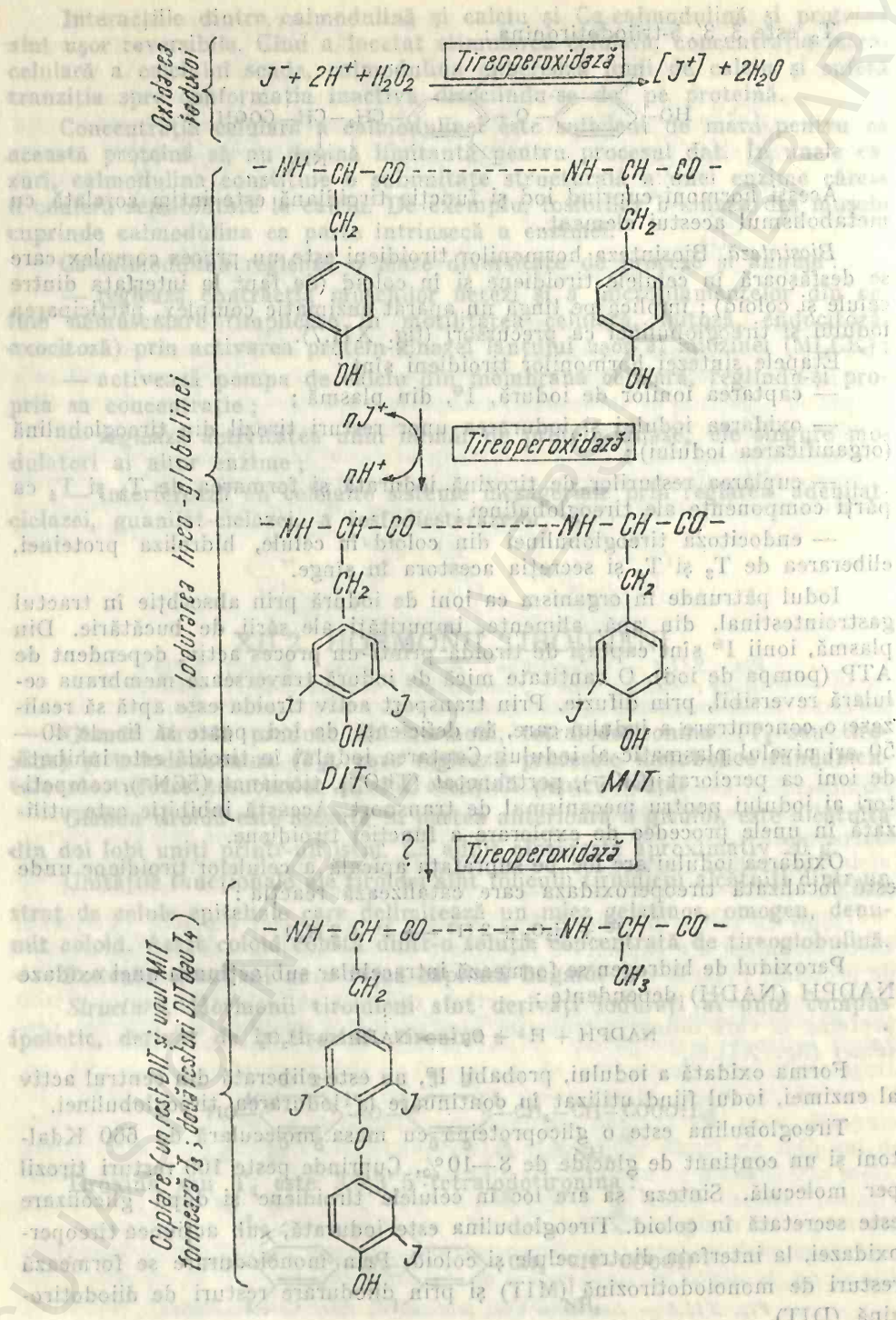


Fig. XII.7 — Biosinteza hormonilor tiroidieni.



Printr-un proces, al cărui mecanism nu este încă cunoscut, la care participă de asemenea tireoperoxidaza, are loc cuplarea resturilor MIT și DIT cu formare de  $T_3$  (dintr-un rest DIT și unul MIT) și  $T_4$  (din două resturi DIT) ce rămân ancorate în lanțul polipeptidic al tireoglobulinei. Tireoglobulina iodurată este păstrată în coloid și reprezintă o rezervă ușor mobilizabilă de hormoni tiroidieni.

Eliberarea  $T_3$  și  $T_4$  din tireoglobulină implică pătrunderea proteinei în celulele tiroidiene. Suprafața apicală a celulelor înglobează picături de coloid și prin endocitoză picăturile sînt internalizate. Urmează apoi fuziunea picăturilor de coloid cu lizozomii și hidroliza tireoglobulinei. Alături de aminoacizi diverși, care intră în fondul metabolic celular, sînt eliberate  $T_4$ ,  $T_3$ , MIT și DIT. Hormonii  $T_3$  și  $T_4$  sînt secretați în sînge. MIT și DIT sînt supuse unui proces de deiodurare (sub acțiunea unei deioduraze NADP-dependență și iodul este recuperat ca  $I^-$ ). Tiroida secretă în principal  $T_4$  și mai puțin  $T_3$ .  $T_3$  din sînge mai provine și prin deiodurarea periferică a  $T_4$ .  $T_3$  este de cîteva ori mai activ biologic decît  $T_4$ . Se consideră că la nivel celular acționează numai  $T_3$ .

**Transport.** Hormonii tiroidieni, insolubili, circulă în plasmă fixați pe două proteine transportoare specifice, TBG (thyroxine-binding globulin) și TBPA (thyroxine-binding prealbumin) și de serumalbumină. TBG, glicoproteină cu masa moleculară de 50 000 daltoni, este sintetizată în ficat și cantitatea de TBG este reglată de diverși factori hormonal. Estrogenii cresc sinteza acestei proteine, androgenii și glucocorticoizii o scad. TBG leagă aproximativ 70% din hormonii tiroidieni, are afinitate mai mare pentru  $T_4$  decît pentru  $T_3$ . Posedă cîte un situs de legare per mol. TBPA leagă numai  $T_4$ , avînd afinitate și capacitate mai mică decît TBG. Serumalbumina, cu afinitate mică dar capacitate mare, transportă aproximativ 10% din  $T_4$  și 30% din  $T_3$ . Activitate biologică prezintă numai hormonii liberi, ceea ce reprezintă 0,03% din totalul  $T_4$  și 0,3% din totalul  $T_3$ .

**Metabolism.** Timpul de înjumătățire pentru  $T_4$  este de 6—7 zile și de 1,5 zile pentru  $T_3$ . Calea majoră de metabolizare a hormonilor tiroidieni constă în deiodurare progresivă la nivelul țesuturilor periferice ca rinichi, ficat, mușchi (fig. XII.8). Prin monodeiodurare  $T_4$  dă naștere la doi compuși  $T_3$  cu activitate hormonală mai mare decît  $T_4$  și  $rT_3$ , biologic inactiv. Aproximativ 30—40% din  $T_4$  formează  $T_3$  și 40% trece în  $rT_3$ .  $T_3$  format prin deiodurare periferică contribuie într-o proporție de 80—90% la realizarea nivelului plasmatic de  $T_3$  circulant. Distribuția  $T_4$  spre formare de  $T_3$  sau  $rT_3$  (depinzînd de activitățile relative ale 5- și 5'-monodeiodurazei) constituie un mecanism de reglare a concentrației hormonilor tiroidieni circulanți.

$T_3$  și  $rT_3$  sînt în continuare deiodurați la diiodotironine,  $T_2$ , și monoiodotironine  $T_1$ , inactive, eliminate rapid din plasmă (fig. XII.8).

$T_4$ , în proporție de aproximativ 20%, este metabolizată și pe alte căi. Este conjugată cu acid glucuronic sau cu acid sulfuric și eliminată prin bilă și prin urină. Prin transformări ale catenei laterale (transaminare și decar-

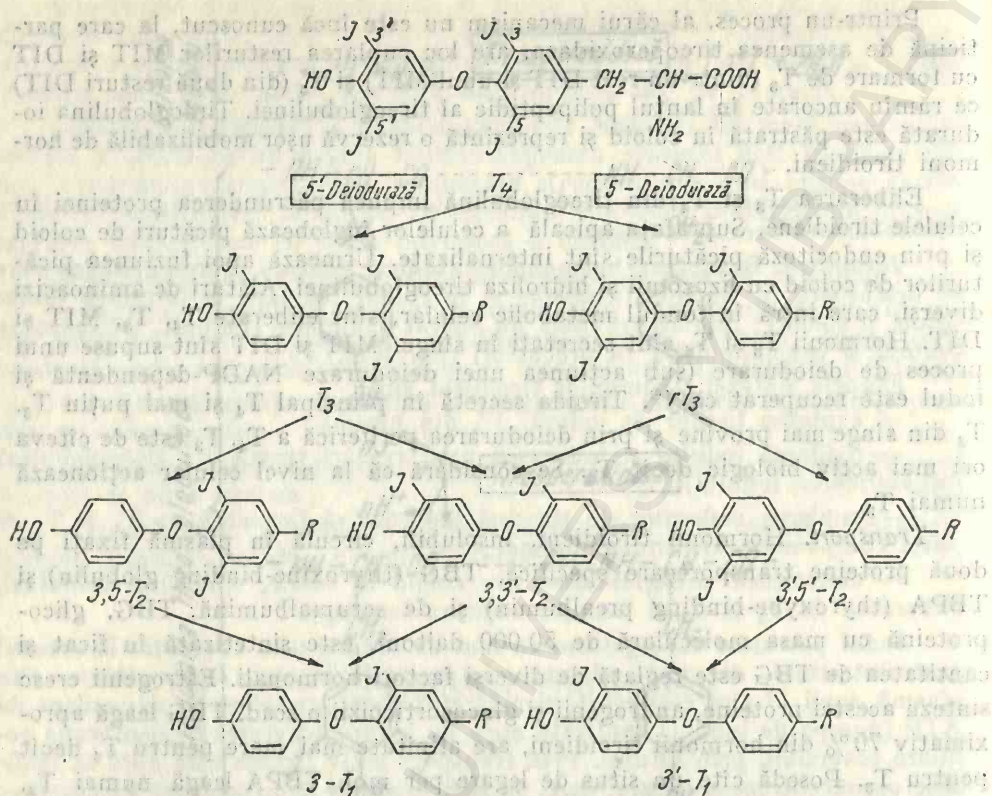
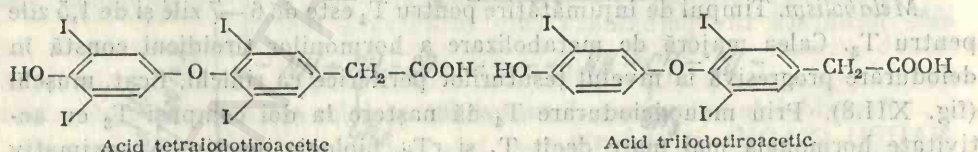


Fig. XII.8 — Deiodurarea  $T_4$ .

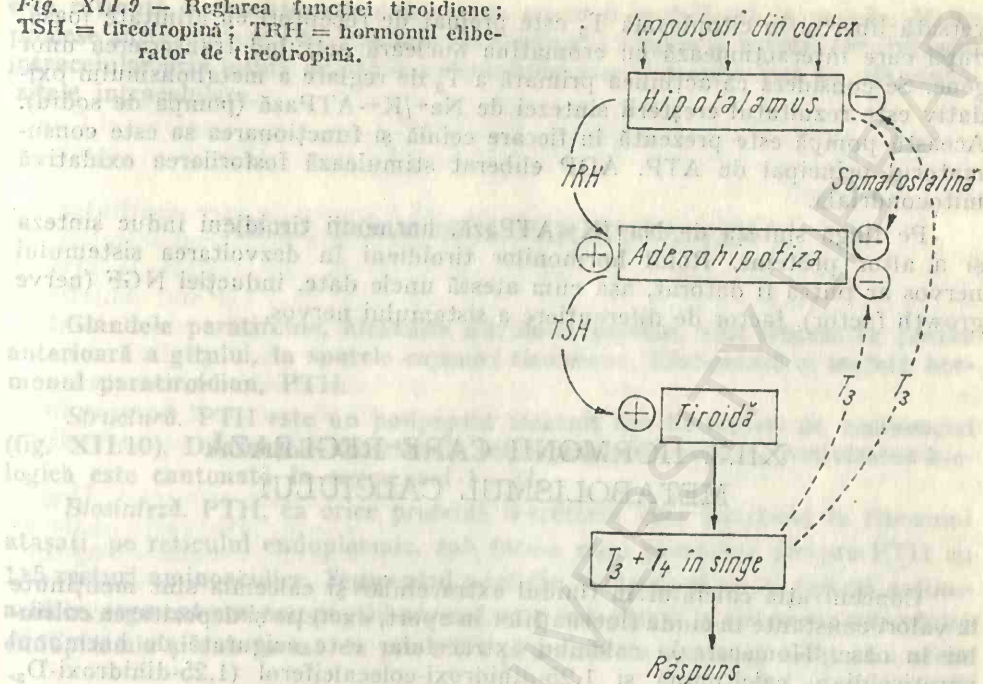
boxilare oxidativă),  $T_4$  și  $T_3$  dau naștere la acizii triiodo- și tetraiodotiroacetic, cataboliți solubili, excretabili prin urină :



**Reglare.** Sinteza și secreția de hormoni tiroidieni se află sub controlul unui sistem feedback negativ la care participă tireotropina hipofizară (TSH), hormonul hipotalamic eliberator de tireotropină (TRH) și hormonii tiroidieni circulanți (fig. XII.9). Sinteza și secreția de TRH este controlată de centri nervoși din creier prin intermediul hormonilor tiroidieni din plasmă. Nivele scăzute de  $T_3$  stimulează formarea de TRH care, la rândul lor, determină sinteza și secreția de TSH. TSH acționează asupra tiroidei (via AMP<sub>c</sub>) activând transportul iodului în tiroidă, organificarea iodului, endocitoza și hidroliza tireoglobulinei și secreția de hormoni în sânge. Creșterea nivelului plasmatic al hormonilor tiroidieni blochează evenimentele anterioare, pe de o parte, prin acțiune inhibitorie la nivelul hipotalamusului și, pe de alta,



Fig. XII.9 — Reglarea funcției tiroidiene; TSH = tireotropină; TRH = hormonul eliberator de tireotropină.



prin inhibiția secreției de TSH. La aceste mecanisme reglatorii participă numai  $T_3$ , prezent ca atare în sânge sau care se formează prin deiodurarea  $T_4$  în hipofiză.

În afara controlului hipotalamo-hipofizar, tiroida posedă mecanisme de autoreglare pentru menținerea stării de eutiroidie, independente de TSH. În deficiență de iod tiroida secretă mai mult  $T_3$  decât în mod normal,  $T_3$  este mai sărac în iod dar mai activ biologic. De asemenea, pentru a compensa scăderea iodului plasmatic, are loc o creștere a captării iodului în tiroidă. În cazul creșterii concentrației  $I^-$  intratiroidal, diminuează viteza etapelor de organificare a iodului (effect Wolff-Chaikoff).

Un alt mecanism reglator al nivelului hormonilor tiroidieni circulanți este transformarea  $T_4$  în  $T_3$  versus  $rT_3$ . În inaniție este favorizată conversia  $T_4 \rightarrow rT_3$  pentru a diminua arderile și consumul de materiale energogene.

**Acțiuni biologice.** Funcția metabolică generală a hormonilor tiroidieni este aceea de a controla metabolismul oxidativ, procesele de ardere, prin care se obține energie metabolică (ATP) și căldură (acțiune calorigenă). Sub acțiunea hormonilor tiroidieni, crește viteza metabolismului bazal, diminuează rezervele energetice lipidice sau glucidice, catabolismul proteic este intensificat (bilanțul azotat se negativează).

Totodată, hormonii tiroidieni joacă roluri esențiale în dezvoltarea fetală și postnatală, în particular asupra sistemului nervos și scheletic.

La nivel celular hormonii tiroidieni ca și cei steroidici, acționează prin activarea unor gene care sînt transcrise și exprimate ca proteine cu funcții specifice. Se admite că numai  $T_3$  este activ. Membrana celulară pare a fi tra-

versată liber și în citoplasmă  $T_3$  este preluat de receptori cu afinitate joasă, după care interacționează cu cromatina nucleară activând transcrierea unor gene. Se consideră că acțiunea primară a  $T_3$  de reglare a metabolismului oxidativ este rezultatul creșterii sintezei de  $Na^+/K^+-ATPază$  (pompa de sodiu). Această pompă este prezentă în fiecare celulă și funcționarea sa este consumatorul principal de ATP. ADP eliberat stimulează fosforilarea oxidativă mitocondrială.

Pe lângă sinteza de  $Na^+/K^+-ATPază$ , hormonii tiroidieni induc sinteza și a altor proteine. Rolul hormonilor tiroidieni în dezvoltarea sistemului nervos ar putea fi datorat, așa cum atestă unele date, inducției NGF (nerve growth factor), factor de diferențiere a sistemului nervos.

### XII.3. HORMONII CARE REGLEAZĂ METABOLISMUL CALCIULUI

Concentrația calciului în fluidul extracelular și calcemia sînt menținute la valori constante în ciuda fluctuațiilor în aport, excreție și depozitarea calciului în oase. Homeostazia calciului extracelular este asigurată de hormonul paratiroidian, calcitonină și 1,25-dihidroxi-colecalciferol (1,25-dihidroxi- $D_3$ , 1,25(OH) $_2D_3$ ) care acționează asupra osului, rinichiului și intestinului.

Corpul omului cuprinde aproximativ 1 kg calciu, cea mai mare parte (99%) găsindu-se în oase și dinți sub formă de hidroxiapatită insolubilă. O fracțiune a calciului din os (1—2%) se află în fluidul periosteal și pe suprafața osului și participă la schimbul cu calciul extracelular. Calciul din oase, pe lângă rolul structural, reprezintă o sursă de calciu pentru asigurarea homeostaziei extracelulare.

Calcemia este cuprinsă între 9 și 11 mg/dl (2,25—2,75 mmoli/l). Calciul plasmatic este alcătuit din trei fracțiuni :

—  $Ca^{2+}$  complexat de anioni cu moleculă mică ca citrat, fosfat ; el reprezintă aproximativ 6% din total ;

—  $Ca^{2+}$  complexat de proteine, în special de serumalbumină ;

—  $Ca^{2+}$  liber, calciu ionizat, care reprezintă aproximativ jumătate din total.

Calciul ionizat reprezintă forma activă a calciului și concentrația sa este foarte fin controlată, cu variații interindividuale foarte mici (1,1—1,3 mmoli/l). Ionii de calciu reglează în organism procese fundamentale ex. coagularea sîngelui, neurosecreția, contracția musculară, activitatea unor enzime, secreția de hormoni, mediază acțiunile intracelulare ale unor hormoni.

Calciul intracelular reprezintă numai o mică fracțiune din calciul total. Concentrația calciului intracelular citosolic este de 1 000—10 000 ori mai mică decît a calciului extracelular și este menținută la un nivel foarte scăzut printr-o permeabilitate naturală foarte redusă a membranei plasmatică pentru calciu și prin funcționarea unor mecanisme active și foarte eficiente de scoatere a calciului din celule (pompe de calciu). În mitocondrii și reticul endoplasmic



este reținută o cantitate de calciu care poate fi mobilizată la nevoie. Multe procese intracelulare sînt mediate de fluctuații ample și rapide ale calciului intracelular prin influx de calciu extracelular sau prin eliberarea sa din depozitele intracelulare.

### XII.3.1. HORMONUL PARATIROIDIAN

Glandele paratiroide, alcătuite din două perechi, sînt situate în partea anterioară a gîtului, în spatele capsulei tiroidiene. Elaborează și secretă hormonul paratiroidian, PTH.

**Structură.** PTH este un polipeptid alcătuit din 84 resturi de aminoacizi (fig. XII.10). Diferențele structurale interspecii sînt reduse. Activitatea biologică este cantonată în segmentul 1—34.

**Biosinteză.** PTH, ca orice proteină secretorie, este sintetizat în ribozomi atașați pe reticulul endoplasmic, sub forma unui precursor pre-pro-PTH cu 115 resturi aminoacidice. Segmentul peptidic N-terminal cu 25 resturi aminoacidice, segment pre- sau peptid-semnal, este îndepărtat în cisternele reticulului endoplasmic și sub formă de pro-PTH pătrunde în aparatul Golgi. La acest

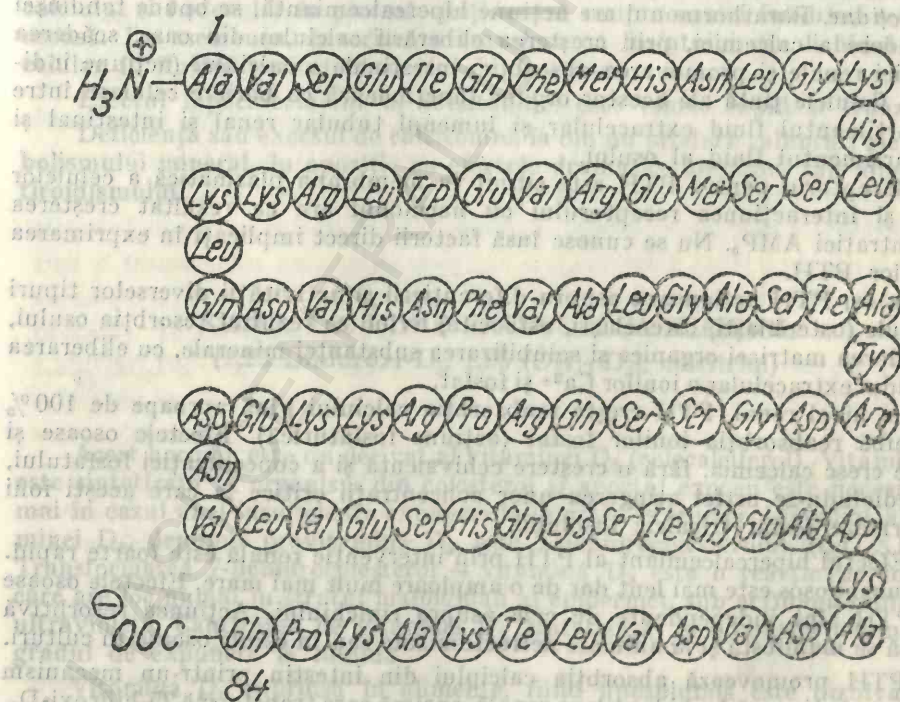


Fig. XII.10 — Structura parathormonului.

nivel pierde segmentul pro-, un hexapeptid N-terminal și devine hormonul activ, PTH. PTH nou sintetizat poate fi secretat imediat, stocat în granule de depozit sau este degradat sub acțiunea unor peptidaze intracelulare (trypsin-like). Principalele fragmente rezultate sînt PTH<sub>1-36</sub> și PTH<sub>37-84</sub>. Fragmentul N-terminal este rapid degradat la di- și tripeptide. Fragmentul C-terminal este depozitat în granule împreună cu PTH și este eliberat în circulație odată cu acesta din urmă.

**Controlul secreției.** Spre deosebire de alți hormoni la care cantitatea de hormon circulant depinde de viteza de sinteză și/sau de ritmul secreției, în cazul glandelor paratiroidiene cantitatea de PTH este reglată la nivelul degradării intraglandulare. Pre-pro-PTH, pro-PTH și PTH sînt sintetizați continuu și într-un ritm constant, independent de fluctuațiile calciului extracelular. Cantitatea de PTH din glandă depinde de viteza degradării sale, ea fiind dependentă de calcemie. Creșterea calcemiei accelerează degradarea, și o scădere a calcemiei diminuează degradarea PTH, mai mult hormon fiind disponibil pentru secreție. De asemenea, eliberarea hormonului este stimulată de scăderea calcemiei.

**Metabolism.** Timpul de înjumătățire al PTH circulant este scurt. Degradarea sa are loc în țesuturi periferice, în special în ficat, prin reacții analoge cu acelea care au loc în paratiroidă. Fragmentele peptidice rezultate (fragment N-terminal și C-terminal) trec în sistemul circulator și se adaugă acelor eliberate din paratiroide. Fragmentele N-terminale, cu activitate biologică, au  $t_{1/2} < 10$  minute; fragmentele C-terminale au vieți mai lungi ( $t_{1/2}$  de 20—40 minute).

**Acțiune.** Parathormonul are acțiune hipercalcemiantă, se opune tendinței de scădere a calcemiei, prin creșterea eliberării calciului din oase, scăderea excreției renale și promovarea absorbției intestinale a calciului (acțiune indirectă). Celulele țintă ale acestor organe funcționează ca bariere celulare între compartimentul fluid extracelular și lumenul tubular renal și intestinal și compartimentul fluid al osului.

Receptorul pentru PTH este situat în membrana plasmatică a celulelor țintă și interacțiunea receptorului cu hormonul are ca rezultat creșterea concentrației AMP<sub>c</sub>. Nu se cunosc însă factorii direct implicați în exprimarea efectelor PTH.

În os, PTH acționează asupra diferențierii și activității diverselor tipuri de celule (osteoblaști, osteoclaști, osteocite) avînd ca rezultat resorbția osului, degradarea matricei organice și solubilizarea substanței minerale, cu eliberarea în fluidul extracelular a ionilor Ca<sup>2+</sup> și fosfat.

La nivel renal, PTH crește reabsorbția calciului pînă aproape de 100% și inhibă reabsorbția ionilor fosfat (acțiune fosfaturică). Efectele osoase și renale cresc calcemia, fără o creștere echivalentă și a concentrației fosfatului, împiedicîndu-se astfel atingerea unor concentrații critice la care acești ioni să formeze fosfat tricalcic insolubil.

Efectul hipercalcemiant al PTH prin intervenție renală este foarte rapid. Răspunsul osos este mai lent dar de o amploare mult mai mare. Efectele osoase ale PTH sînt independente de cele asupra rinichiului. Acțiunea resorbtivă osoasă se manifestă și la animale nefrectomizate sau în celule osoase în culturi.

PTH promovează absorbția calciului din intestin printr-un mecanism indirect. Activează 1 $\alpha$ -hidroxilaza renală, enzimă care transformă 25-hidroxi-D<sub>3</sub>, inactiv, în 1,25-dihidroxi-D<sub>3</sub>, metabolitul activ al vitaminei D<sub>3</sub>.



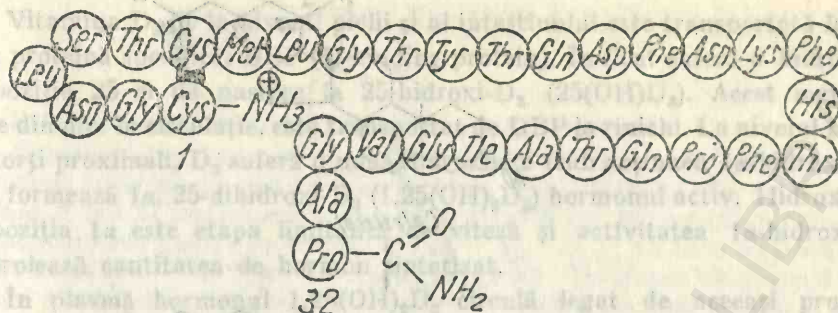


Fig. XII.11 — Structura calcitoninei.

### XII.3.2. CALCITONINA

Calcitonina este produsă de celulele C adiacente celulelor foliculare ale tiroidei. Este un polipeptid cu 32 resturi aminoacidice și masa de 3 700 daltoni. Cuprinde o punte disulfurică între primul și al șaptelea rest aminoacidic (fig. XII.11).

Calcitonina are efecte opuse cu ale PTH, se opune creșterii concentrației calciului și fosforului în plasmă. Acționează asupra osului inhibând resorbția osoasă. De asemenea, favorizează translocarea fosfatului din lichidul extracelular în fluidul periosteal și în celule osoase.

Efectul hipocalcemiant al calcitoninei este foarte rapid și tranzitoriu.

Deficiența sau excesul de calcitonină la om nu produce tulburări ale metabolismului mineral, în opoziție cu efectele dramatice ale hipo- sau hiperparatiroidismului.

### XII.3.3. 1,25-DIHIDROXI-COLECALCIFEROL

(1,25 Dihidroxi-D<sub>3</sub>, 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>), calcitriol)

Acest hormon este un derivat al vitaminei D<sub>3</sub> (colecalfiferol). Vitamina D<sub>3</sub> este sintetizată în organism din colesterol și aportul exogen este necesar numai în cazul unei insuficiente expuneri la lumină. Precursorul imediat al vitaminei D<sub>3</sub>, denumit provitamină D<sub>3</sub>, este 7-dehidrocolesterolul (fig. XII.12). Transformarea 7-dehidrocolesterol → vitamină D<sub>3</sub> este o reacție de fotoliză care are loc numai în stratul malpighian al epidermei, sub acțiunea radiațiilor ultraviolete. Cantitatea de vitamină D<sub>3</sub> sintetizată în organism depinde de gradul de expunere la lumină.

Vitamina D<sub>3</sub> cuprinsă în alimente, fiind liposolubilă este dizolvată în grăsimi și este absorbită împreună cu lipidele.

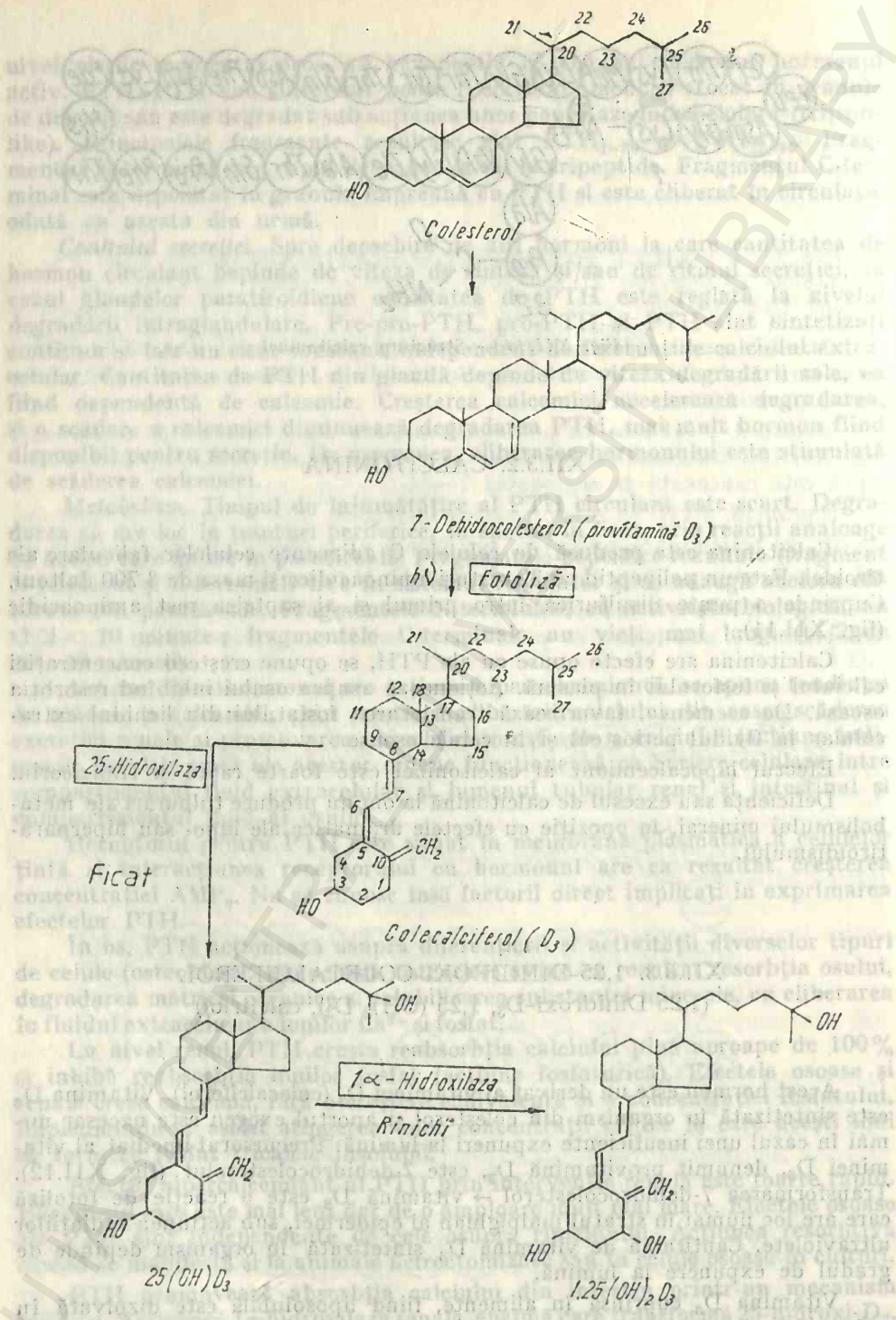


Fig. XII.12.1 — Sinteza 1,25-dihidroxi- $D_3$ .



Vitamina  $D_3$  de la nivelul pielii și al intestinului este transportată la ficat de o proteină specifică, DBP (D-binding protein). În ficat suferă o hidroxilare în poziția 25 și dă naștere la 25-hidroxi- $D_3$  ( $25(OH)D_3$ ). Acest metabolit trece din nou în circulație, este transportat de DBP la rinichi. La nivelul tubilor contorți proximali,  $D_3$  suferă o nouă hidroxilare (sub acțiunea  $1\alpha$ -hidroxilazei) și se formează  $1\alpha$ , 25-dihidroxi- $D_3$  ( $1,25(OH)_2D_3$ ) hormonul activ. Hidroxilarea în poziția  $1\alpha$  este etapa limitantă de viteză și activitatea  $1\alpha$ -hidroxilazei controlează cantitatea de hormon sintetizat.

În plasmă hormonul  $1,25(OH)_2D_3$  circula legat de aceeași proteină, DBP.

*Metabolism:*  $1,25(OH)_2D_3$  are o viață foarte scurtă. Este inactivată în rinichi prin hidroxilări suplimentare în pozițiile 23, 24, 26, la metaboliți inactivi. Calea de eliminare este bila.

*Controlul sintezei calcitriolului* se exercită în etapa trecerii  $25(OH)D_3$  în  $1,25(OH)_2D_3$  sub acțiunea  $1\alpha$ -hidroxilazei. Prin mecanism feedback produsul final inhibă propria sa formare. PTH direct sau prin acțiunea sa hipofosfatemiantă stimulează activitatea  $1\alpha$ -hidroxilazei și sinteza de calcitriol.

Un alt mecanism de reglare a sintezei de calcitriol se realizează prin scăderea activității 24-hidroxilazei de către PTH. Când activitatea enzimei este mare intră în competiție cu  $1\alpha$ -hidroxilaza și transformă  $25(OH)D_3$  în  $24, 25(OH)_2D_3$ , metabolit inactiv. Scăderea activității 24-hidroxilazei va facilita intervenția  $1\alpha$ -hidroxilazei și sinteza hormonului. Creșterea concentrației de PTH favorizează sinteza de calcitriol prin activarea  $1\alpha$ -hidroxilazei și inactivarea 24-hidroxilazei (fig. XII.12.2).

*Acțiune.*  $1,25(OH)_2D_3$  este un hormon liposolubil cu o structură înrudită cu a steroizilor și mecanismul de acțiune la nivel celular este similar. Interacționează cu un receptor nuclear și complexul hormon-receptor activează cromatina și transcrierea unor gene specifice. O proteină a cărei sinteză este indusă de calcitriol este proteina de legare a calciului din intestin (CBP, Ca-binding protein). Totuși această proteină nu exprimă toate acțiunile hormonale ale  $1,25(OH)_2D_3$ . În afară de intestin, au fost identificați receptori pentru  $1,25(OH)_2D_3$  în celule osoase și alte țesuturi. Hormonul ar interveni în promovarea diferențierii celulare.

Țesutul țintă de predilecție al  $1,25(OH)_2D_3$  este intestinul unde promovează absorbția calciului și a fosfatului, translocarea lor din lumen în spațiul extracelular. Acest proces are loc în trei timpi: (1) traversarea marginii în perie și a membranei microvilare; (2) transportul prin celule; (3) traversarea membranei bazale și intrarea în fluidul extracelular. Nu este încă stabilit în ce etapă și prin ce mecanism intervine calcitriolul. Inducția sintezei de CBP nu poate explica singură creșterea absorbției de calciu și fosfat prin peretele intestinal.

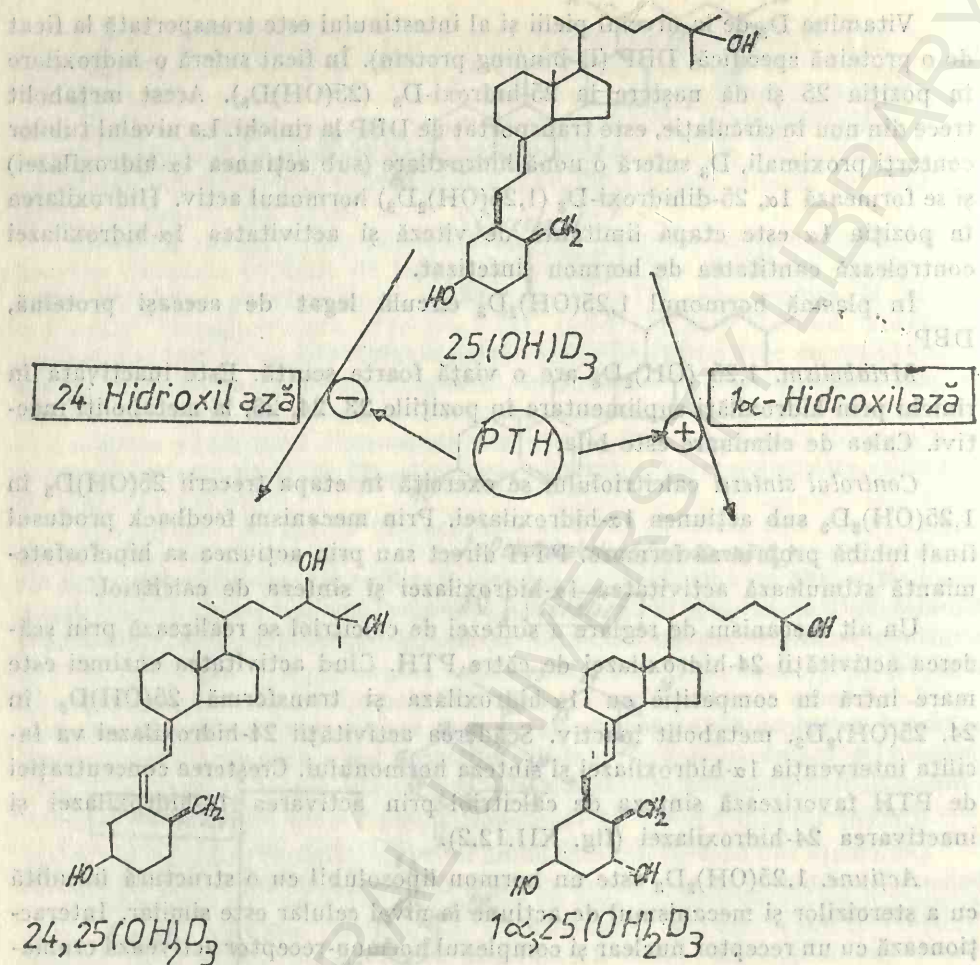


Fig. XII.12.2 — Reglarea biosintezei calcitriolului.

## XII.4. HORMONII PANCREATICI

Activitatea endocrină a pancreasului este localizată la nivelul insulelor Langerhans. Diversele tipuri de celule insulare, A, B, D, F, secretă fiecare un hormon. Celulele B sau β (70% din numărul total de celule) secretă insulina, celulele A sau α (25%) glucagon, celulele D (<5%) somatostatină și celulele F, polipeptidul pancreatic.

Insulina și glucagonul sunt factorii reglatori principali ai homeostaziei glicemice, somatostatina reglează secreția de insulină și de glucagon. Polipeptidul pancreatic reglează diverse funcții ale tractului gastrointestinal.



## XII.4.1. INSULINA

Este principalul hormon cu acțiune hipoglicemiantă.

**Structură.** Insulina este o proteină mică, cu masa moleculară de 5 734 daltoni și cuprinde 51 resturi aminoacidice. Este alcătuită din două lanțuri, un lanț A (cu 21 resturi aminoacidice) și unul B (cu 30 resturi aminoacidice) legate prin două punți disulfurice ( $A_7-B_7$  și  $A_{20}-B_{19}$ ); o a treia legătură disulfurică leagă restul  $Cis-A_6$  cu  $Cis-A_{11}$  (fig. XII.13). Insulinele altor specii diferă de cea umană. Diferența cea mai mică există între insulina umană și cea de porc, acestea deosebindu-se numai prin natura restului C-terminal al lanțului B. La om este treonină, la porc, alanină. Insulina de porc din care s-a detașat treonina terminală este practic lipsită de antigenicitate și este folosită în tratamentul diabetului. Prin tehnologia ADN recombinant s-a obținut insulina umană pentru uz terapeutic.

Insulina formează cu ioni  $Zn^{2+}$  agregate, dimeri, tetrameri, hexameri. În pancreas insulina se află sub formă de hexameri. Forma activă circulantă este, probabil, monomerul.

**Biosinteză.** Insulina, ca și alte proteine secretorii, este sintetizată sub forma unui precursor, pre-pro-insulină. Segmentul N-terminal, pre-, cu 23 aminoacizi, peptidul semnal hidrofob are rolul de a conduce polipeptidul născând în cisternele reticulului endoplasmic unde este îndepărtat. Pro-insulina, polipeptid cu 86 resturi aminoacidice, cuprinde lanțurile A și B ale moleculei virtuale de insulină legate prin punți disulfurice. Capătul N-terminal al lanțului A este legat de capătul C-terminal al lanțului B prin intermediul unui peptid de legătură.

Pro-insulina este transportată din reticulul endoplasmic în aparatul Golgi unde este transformată în insulină. Prelucrarea pro-insulinei are loc sub acțiunea unei endopeptidaze care rupe două legături peptidice flancate de resturi aminoacidice bazice rezultând trei fragmente. Urmează acțiunea unei

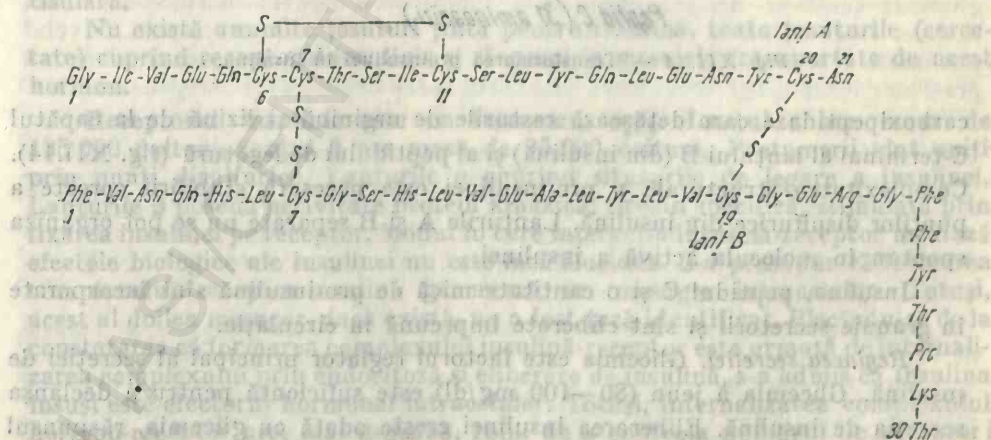


Fig. XII.13 — Structura insulinei.

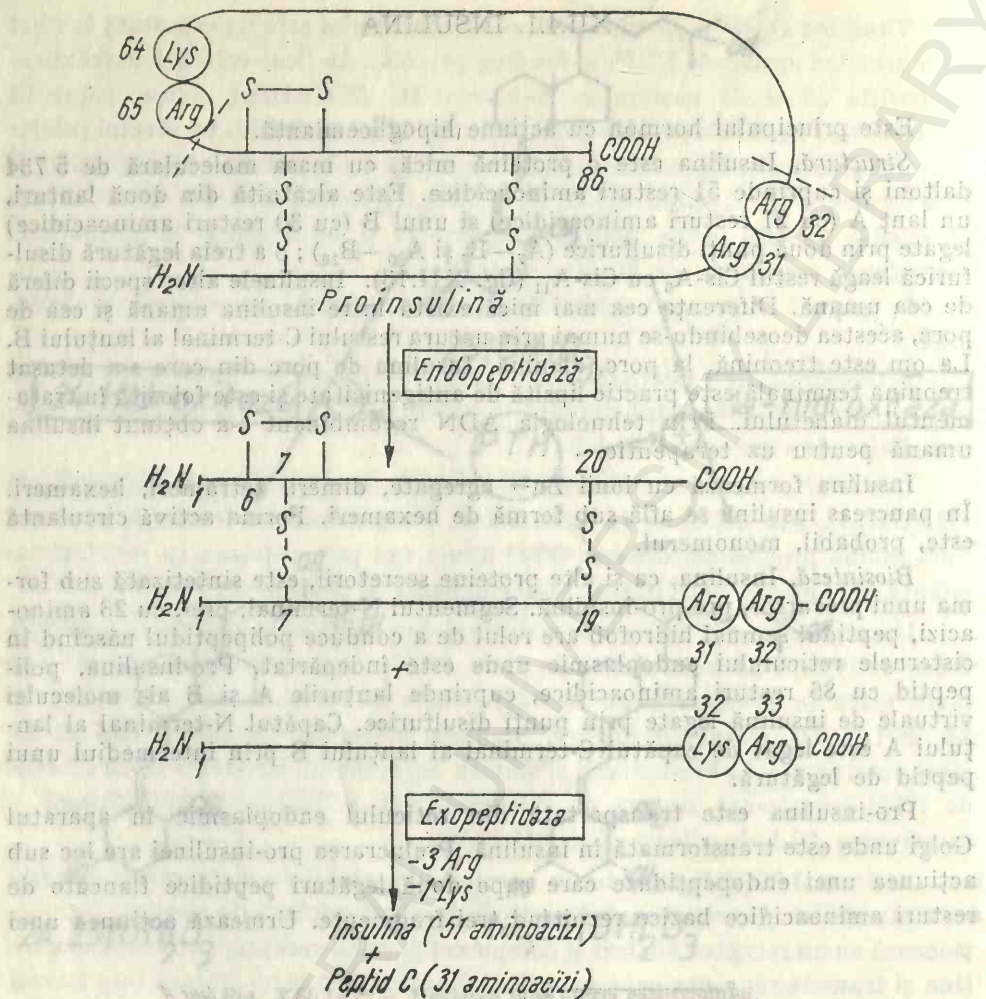


Fig. XII.14 — Transformarea proinsulinei în insulină.

carboxipeptidaze care detasează resturile de arginină și lizină de la capătul C-terminal al lanțului B (din insulină) și al peptidului de legătură (fig. XII.14). Complexitatea structurală a pro-insulinei este necesară stabilirii corecte a punților disulfurice din insulină. Lanțurile A și B separate nu se pot organiza spontan în moleculă activă a insulinei.

Insulina, peptidul C și o cantitate mică de pro-insulină sînt încorporate în granule secretorii și sînt eliberate împreună în circulație.

**Reglarea secreției.** Glicemia este factorul reglator principal al secreției de insulină. Glicemia à jeun (80—100 mg/dl) este suficientă pentru a declanșa secreția de insulină. Eliberarea insulinei crește odată cu glicemia, răspunsul maxim obținîndu-se la 300—500 mg/dl.



În afară de glucoză mulți alți factori influențează secreția de insulină :  
— alte monozaharide ușor metabolizabile ca fructoza, manoza au efect stimulator ;

— aminoacizii, în special arginina, lizina și leucina, stimulează puternic secreția de insulină ;

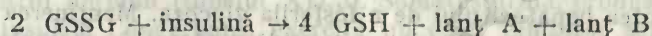
— agonistii  $\alpha$ -adrenergici inhibă secreția de insulină ; adrenalina prin  $\alpha$ -recepție este un inhibitor fiziologic al secreției de insulină ;

— somatostatina, produsă de celulele D din pancreas, prin acțiune paracrină inhibă secreția de insulină ;

— GIP (gastric inhibitory polypeptide), polipeptid eliberat de mucoasa duodenală și jejunală la ingestia de glucoză stimulează eliberarea de insulină ; acțiunea GIP explică constatarea mai veche că glucoza administrată oral este un secretagog mai puternic pentru insulină decât glucoza administrată intravenos.

**Metabolism.** Timpul de înjumătățire al insulinei este de 3—5 minute. Insulina este inactivată în principal în ficat, prin două mecanisme :

a) desfacerea legăturilor disulfurice interlanț printr-o reacție de schimb cu glutation, catalizată de glutation-insulin transhidrogenază :



Lanțurile A și B separate sint degradate rapid prin proteoliză ;

b) o protează specifică atacă molecula de insulină ca atare.

**Acțiune.** Insulina controlează procesele fundamentale de stocare și de mobilizare a rezervelor calorice ale organismului, permit adaptarea metabolică a organismului la trecerea de la starea de nutriție la starea de post. Insulina are roluri majore, în special la animalele care se hrănesc intermitent, este mai puțin importantă pentru animalele care primesc hrana continuu (ierbivore). În perioadele de alimentare insulina favorizează depozitarea excesului caloric sub formă de lipide, glicogen, proteine. În perioadele de post aceste rezerve sînt mobilizate prin reacții foarte fin modulate încît utilizarea lor să se facă fără pierderi.

În afară de roluri metabolice insulina exercită acțiuni specifice factorilor de creștere, influențează creșterea fetală, diferențierea celulară, regenerarea tisulară.

Nu există anumite țesuturi țintă pentru insulină, toate țesuturile (cerce-tate) cuprind receptorul insulinic și răspund la mesajele transportate de acest hormon.

Receptorul insulinic este un tetramer,  $\alpha_2\beta_2$ . Lanțul  $\alpha$  are masa de 135 000 daltoni, lanțul  $\beta$  are masă de 95 000 daltoni. Protomerii sînt uniți prin punți disulfurice. Lanțurile  $\alpha$  cuprind situsurile de legare a insulinei. Lanțurile  $\beta$  posedă activitate protein kinazică, tirozin specifică, stimulată prin fixarea insulinei pe receptor. Modul în care interacția insulină-receptor mediază efectele biologice ale insulinei nu este încă elucidat. S-a presupus că formarea complexului receptor-insulină generează un mesager intracelular. Totuși, acest al doilea mesager, dacă există, nu a fost încă identificat. Plecîndu-se de la constatarea că formarea complexului insulină-receptor este urmată de internalizarea complexului prin endocitoză și eliberare de insulină, s-a admis că insulina însuși este efectorul hormonal intracelular. Totuși, internalizarea complexului hormon-receptor are, mai degrabă, rolul de a controla numărul de receptori membranari. Stimularea tisulară prelungită cu insulină, prin internalizarea



complexelor hormon-receptor va duce la scăderea numărului de receptori (down regulation) și diminuarea sensibilității țesutului la insulină.

Legarea insulinei de receptor activează domeniul protein kinazic al subunității  $\beta$ . Kinaza are specificitate pentru resturi tirozil. Kinaza activată autofosforilează subunitățile  $\beta$  ale receptorului ca și alte proteine membranare și intracelulare. Cascada de fosforilări inițiată de formarea complexului insulină-receptor este, în ultimă instanță, răspunzătoare de efectele hormonale ale insulinei. Prin acest mecanism insulina activează fosfodiesteraza și inhibă protein-kinaza A (activată de  $AMP_c$ ). Scăderea concentrației  $AMP_c$  (prin activarea fosfodiesterazei) și diminuarea activității protein-kinazei A sînt opuse cu acelea declanșate de glucagon și explică efectele antagonice ale acestor doi hormoni.

*Efectele insulinei asupra metabolismului glucidic.* Insulina mediază transportul transmembranar al glucozei în adipocite, țesut muscular și alte tipuri de celule. Pentru aceste celule pătrunderea glucozei din spațiul extracelular limitează utilizarea glucozei.

Insulina stimulează pătrunderea glucozei în hepatocit, tip de celulă în care glucoza pătrunde prin difuzie. Insulina induce sinteza glucokinazei și crește capacitatea hepatocitului de a fosforila glucoza. Menținerea unui nivel intracelular scăzut permite difuzia mai rapidă a glucozei extracelulare în hepatocit.

Insulina influențează metabolismul intracelular al glucozei. În hepatocit este activată sinteza de glicogen (glicogenoliza este inhibată), este activată glicoliza. Glucozo-6-fosfataza este inactivată și astfel efluxul celular de glucoză este inhibat. Gluconeogeneza este oprită prin inhibiția transcrierii genei fosfoenolpiruvatcarboxi-kinazei, enzima cheie reglatoare a gluconeogenezei.

În mușchi, în prezența insulinei, metabolismul glucozei este deplasat spre glicogenogeneză (glicogenoliza este inhibată) și spre utilizare glicolitică. În țesutul adipos insulina favorizează glicoliza și sinteza de glicerol fosfat. Acțiunile cumulate ale insulinei asupra metabolismului glucozei au ca efect scăderea glicemiei.

*Acțiunile insulinei asupra metabolismului lipidic.* În țesutul adipos insulina facilitează pătrunderea glucozei, formarea de glicerol fosfat și sinteza de trigliceride (acțiune lipogenetică). Prin inactivarea lipazei hormon-sensibilă, lipoliza este inhibată, efluxul de acizi grași din adipocit este oprit. Nivelul plasmatic scăzut al acizilor grași liberi se opune și el gluconeogenezei (acizii grași cu catenă lungă stimulează gluconeogeneza hepatică) și cetogenezei.

*Acțiunile insulinei asupra metabolismului aminoacizilor și al proteinelor.* Insulina facilitează transportul aminoacizilor cu R neutru în mușchi, stimulează sinteza proteică și încetinește degradarea proteinelor. În afara acestor roluri generale, insulina influențează sinteza unor proteine specifice intervenind la nivelul transcrierii genelor. Multe din acțiunile hormonale ale insulinei au la bază inducția sau represiia sintezei unor proteine specifice, ca glucokinaza, fosfoenolpiruvat carboxikinaza.

*Rolurile insulinei ca factor de creștere.* Studiile in vitro efectuate pe culturi de celule, au arătat că insulina stimulează proliferarea unor tipuri celulare, acționînd ca factor de creștere. Insulina însăși, și receptorul insulinic, prezintă analogie structurală cu IGF (IGF-I și IGF-II, insulin-like growth factors). Receptorul insulinic activat posedă activitate protein-kinazică, însușire întâlnită și la alți receptori (receptorul EGF, epidermal growth factor).



## XII.4.2. GLUCAGONUL

Hormon pancreatic sintetizat în celulele A ( $\alpha$ ) din insulele Langerhans, cu acțiune antagonică insulinei. Este un agent hiperglicemiant.

**Structură, secreție, metabolism.** Glucagonul este un polipeptid cu 29 resturi aminoacidice (fig. XII. 15). Este sintetizat sub forma unui precursor pre-pro-glucagon. Segmentul N-terminal pre-(peptid semnal) este detașat în reticulul endoplasmic. Pro-glucagonul este prelucrat în aparatul Golgi cu formarea mai multor fragmente polipeptidice. În plasmă, alături de glucagon circulă și aceste fragmente inactive.

Glucagonul are  $t_{1/2}$  de aproximativ 5 minute. Este degradat rapid în ficat prin detașarea a două resturi aminoacidice de la capătul N-terminal. Glucagonul este secretat în singele portal și la o singură trecere prin ficat o fracțiune importantă este inactivată. Acțiunile reglatorii majore ale glucagonului se exercită la nivel hepatic.

**Reglarea secreției.** Agentul reglator major al secreției de glucagon este glucoza, care inhibă secreția de glucagon. O serie de alți factori influențează secreția acestui hormon (tabelul XII.5). Somatostatina, produsă de celule de tip D din insulele Langerhans, exercită un efect inhibitor asupra secreției glucagonului.

Tabelul XII.5

Factorii care influențează secreția de glucagon

Agenți stimulatori	Agenți inhibitori
Aminoacizi (în special aminoacizi glicoformatori) Agoniști $\beta$ -adrenergici Gastrină Colecistokinină	Glucoză Somatostatină Secretină Acizii grași liberi din plasmă Agoniști $\alpha$ -adrenergici Acetoacetatul (corp cetonice)

**Acțiuni.** Glucagonul exercită acțiuni metabolice opuse cu ale insulinei, rezultatul global al acestora fiind creșterea glicemiei. Acțiunile sale se exercită în primul rând la nivel hepatic, concentrația sa în singele portal fiind mai mare decât în singele sistemic.

Efectele intracelulare ale glucagonului sînt mediate de  $AMP_c$ , a cărei concentrație crește sub acțiunea hormonului, și de protein-kinaza A activată de  $AMP_c$ . Acțiunea principală a glucagonului este cea gluconeogenetică, sintetiză de glucoză din precursori neglucidici. Glucagonul induce sinteza enzimelor cheie gluconeogenetice, fosfoenolpiruvatcarboxi-kinază, fructozo-1,6-bisfosfataza, glucozo-6-fosfataza. Prin activarea protein kinazei A și conversia enzimelor în forme fosforilate, crește fluxul de metaboliți pe calea gluconeogenezei și diminuează ritmul glicolizei.

Conversia glicogen-fosforilazei și a glicogen-sintetazei în forme fosforilate activează glicogenoliza și inhibă sinteza de glicogen. Glucoza obținută astfel trece în singe, crește glicemia.



Fig. XII.15 — Structura glucagonului.

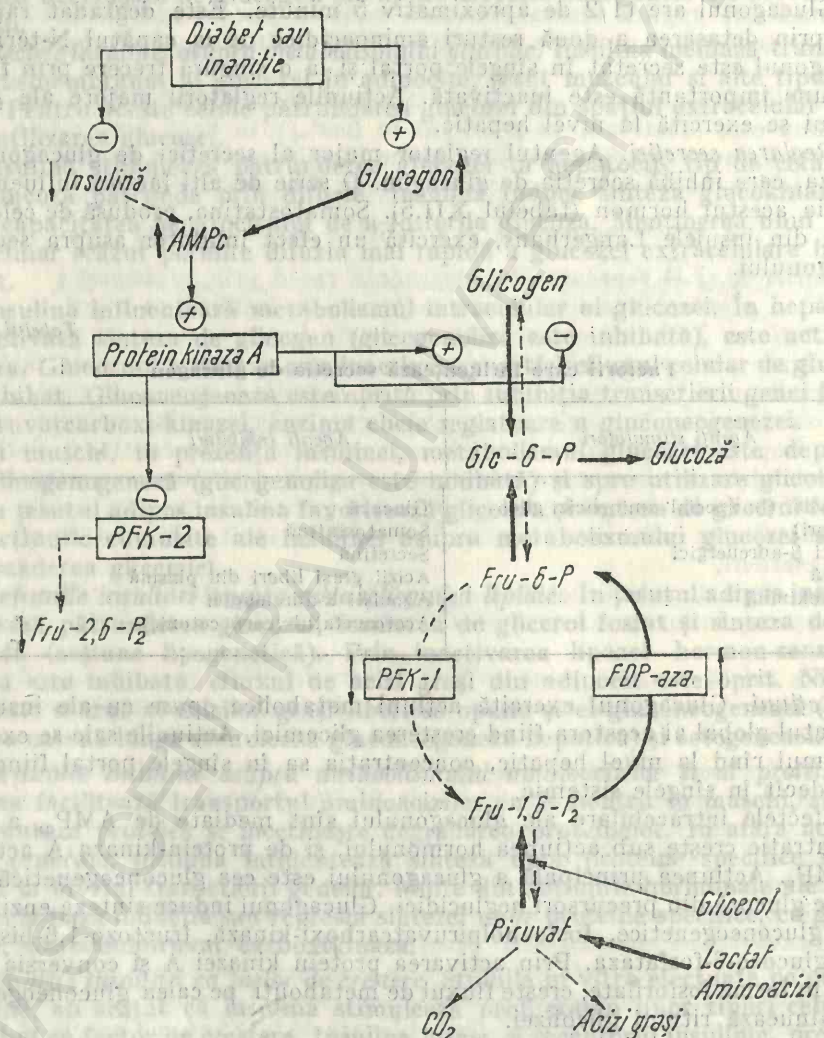


Fig. XII.16 — Metabolismul glucidic hepatic în diabet (sau inanitie), raport insulină/glucagon — scăzut, PFK = fosfofructokinază, 1 sau 2, FDP-aza: fructozo-1,6-difosfatază.



Metabolismul lipidic în hepatocit este deplasat spre  $\beta$ -oxidarea acizilor grași și cetogeneză. Diminuarea glicolizei limitează cantitatea de acetyl-CoA și implicit și de malonil-CoA. Absența malonil-CoA ridică inhibiția pe care aceasta o exercită asupra carnitin-acil transferazei, acizii grași cu catenă lungă pătrund în mitocondrii și sint supuși  $\beta$ -oxidării și sintezei de corpi cetonici. Conversia glucozei în acizi grași și sinteza de trigliceride este diminuată (acțiune antilipogenetică).

Glucagonul nu influențează metabolismul glucidic în mușchi.

Un alt țesut care răspunde la glucagon este țesutul adipos. Prin creșterea concentrației AMP<sub>c</sub>, este activată lipoliza și inhibată lipogeneza. Acizii grași eliberați în sine sint preluați de ficat unde sint supuși oxidării mitocondriale.

În diabet și în inanție glucagonemia este crescută și, respectiv, nivelul plasmatic al insulinei este scăzut (raport insulină/glucagon mic) metabolismul glucidic hepatic este deviat spre cetogeneză și hiperglicemie (fig. XII.16). Un raport insulină/glucagon ridicat, specific perioadelor de aport glucidic, inversează evenimentele de mai sus, metabolismul hepatic este deplasat spre utilizarea glucozei (fig. XII.17).

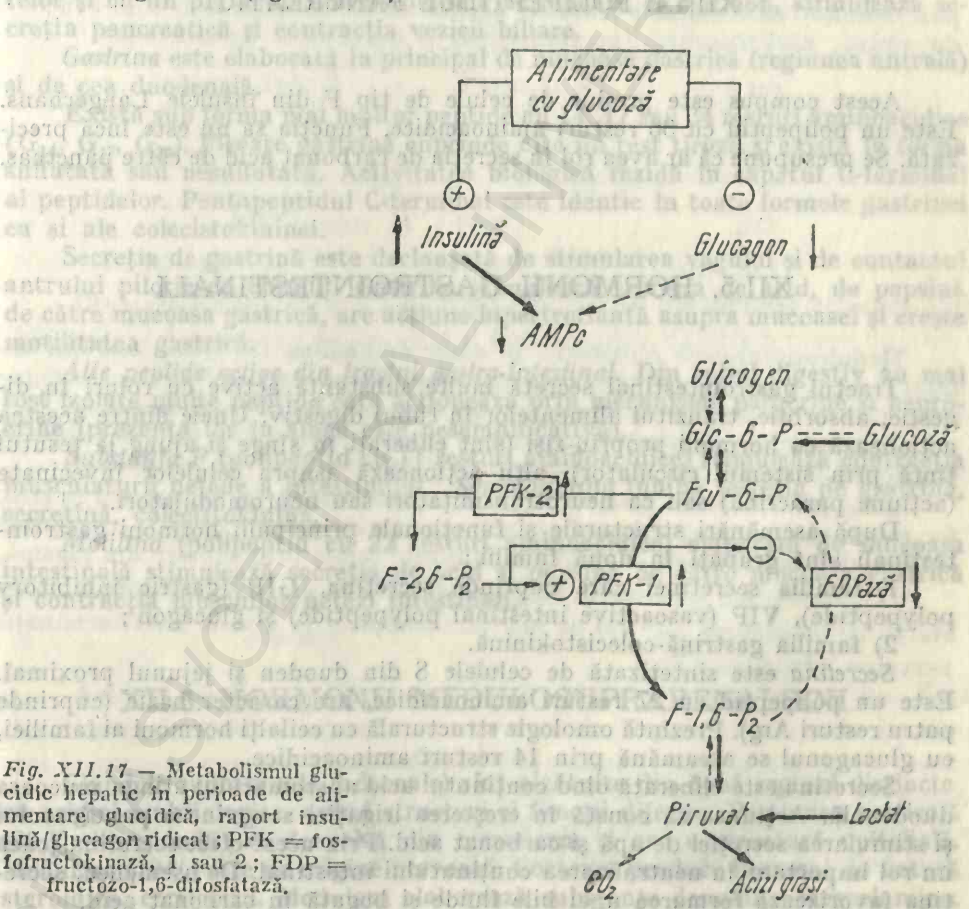


Fig. XII.17 — Metabolismul glucidic hepatic în perioade de alimentație glucidică, raport insulină/glucagon ridicat; PFK = fosfofructokinază, 1 sau 2; FDP = fructo-1,6-difosfatază.

#### XII.4.3. SOMATOSTATINĂ

Acest hormon a fost descris inițial ca factor hipotalamic care inhibă eliberarea somatotropinei hipofizare (GH-RH). Ulterior somatostatina a fost identificată și în pancreas (este produsă de celule D insulare), în tractul gastrointestinal, în creier.

Somatostatina este elaborată sub forma unui precursor cu greutate moleculară relativ mare. Prin prelucrarea acestuia rezultă două forme active ale somatostatinei, cuprinzând 28 și, respectiv, 14 resturi aminoacidice.

Somatostatina prin acțiune paracrină inhibă secreția de glucagon, insulină și a unor hormoni gastrointestinali, secretină, colecistokinină, GIP (gastric inhibitory polypeptide).

Somatostatina în creier are probabil funcție de neurotransmițător.

#### XII.4.4. POLIPEPTIDUL PANCREATIC

Acest compus este produs de celule de tip F din insulele Langerhans. Este un polipeptid cu 36 resturi aminoacidice. Funcția sa nu este încă precizată. Se presupune că ar avea rol în secreția de carbonat acid de către pancreas.

#### XII.5. HORMONII GASTROINTESTINALI

Tractul gastrointestinal secretă multe substanțe active cu roluri în digestie, absorbție, tranzitul alimentelor în tubul digestiv. Unele dintre acestea acționează ca hormoni propriu-ziși (sînt eliberați în singe și ajung la țesutul țintă prin sistemul circulator), alții acționează asupra celulelor învecinate (acțiune paracrină) sau ca neurotransmițători sau neuromodulatori.

După asemănări structurale și funcționale principalii hormoni gastrointestinali sînt grupați în două familii:

- 1) familia secretinei care cuprinde secretina, GIP (gastric inhibitory polypeptide), VIP (vasoactive intestinal polypeptide) și glucagon;
- 2) familia gastrină-colecistokinină.

Secretina este sintetizată de celulele S din duoden și jejunul proximal. Este un polipeptid cu 27 resturi aminoacidice, are caracter bazic (cuprinde patru resturi Arg). Prezintă omologie structurală cu ceilalți hormoni ai familiei, cu glucagonul se aseamănă prin 14 resturi aminoacidice.

Secretina este eliberată cînd conținutul acid al stomacului atinge mucoasa duodenală. Acțiunea sa constă în creșterea irigației sanguine a pancreasului și stimularea secreției de apă și carbonat acid. Prin acest efect secretina joacă un rol important în neutralizarea conținutului intestinal. De asemenea, secretina favorizează formarea unei bile fluide și bogată în carbonat acid.



**GIP (gastric inhibitory polypeptide).** Acest polipeptid cu 43 resturi aminoacidice este produs de mucoasa duodenală și jejunală. Are acțiune inhibitorie asupra motilității și secreției gastrice. De asemenea stimulează eliberarea de insulină de către celulele  $\beta$  pancreatice.

**VIP (vasoactive intestinal polypeptide).** Polipeptid cu 28 resturi aminoacidice. Este prezent în nervi și vase și prin acțiune paracrină reglează motilitatea tubului digestiv, relaxarea sfincterelor, debitul sanguin.

**Glucagonul** este produs de celule A răspândite în mucoasa gastrică și intestinală. Nu se cunoaște rolul fiziologic al glucagonului format la acest nivel. Ileonul și colonul sintetizează polipeptide cu structuri și funcții similare cu cele ale glucagonului (enteroglucagon).

**Colecistokininele.** Celulele mucoasei duodenale și ale jejunului proximal elaborează un polipeptid, precursor prin a cărui prelucrare rezultă, peptidele active cuprinzând de la 4 la 39 resturi aminoacidice (CCK 4, CCK 8, CCK 12, CCK 33 și CCK 39). În plasmă se află în cantitatea cea mai mare colecistokinina 8.

Secreția de colecistokinină este declanșată de contactul mucoasei intestinale cu conținutul stomacal cuprinzând produsele digestiei parțiale a alimentelor și cu un pH acid. Colecistokinina acționează ca hormon, stimulează secreția pancreatică și contracția vezicii biliare.

**Gastrina** este elaborată în principal de mucoasa gastrică (regiunea antrală) și de cea duodenală.

Există sub forma mai multor peptide cu 14, 17 sau 34 resturi aminoacidice ( $G_{14}$ ,  $G_{17}$ ,  $G_{34}$ ). Fiecare gastrină cuprinde câte un rest tirozil și există în formă sulfată sau nesulfată. Activitatea biologică rezidă în capătul C-terminal al peptidelor. Pentapeptidul C-terminal este identic în toate formele gastrinei ca și ale colecistokininei.

Secreția de gastrină este declanșată de stimularea vagului și de contactul antrului piloric cu chimul. Gastrina stimulează secreția de acid, de pepsină de către mucoasa gastrică, are acțiune hipertrofiantă asupra mucoasei și crește motilitatea gastrică.

**Alte peptide active din tractul gastro-intestinal.** Din tubul digestiv au mai fost izolate multe peptide care acționează prin mecanisme paracrine și neurocrine (prezența lor în sine este nesemnificativă).

**Substanța P** (polipeptid cu 11 resturi aminoacidice) stimulează contracția musculaturii netede a intestinului. **Somatostatina** inhibă secreția de gastrină, secretină, colecistokinină.

**Motilina** (polipeptid cu 22 resturi aminoacidice) elaborată de mucoasa intestinală stimulează secreția de acid și pepsină de către mucoasa gastrică și contracția mușchilor netezi intestinali.

## XII.6. HORMONII MEDULOSUPRARENALIENI

Glandele suprarenale (adrenale) sînt alcătuite din două regiuni distincte cu origini embriologice, avînd structuri și funcții diferite. Porțiunea corticală (90% din glandă) se dezvoltă din mezoderm și are o structură epitelială. Medulara (10%) este de origine nervoasă. Cortexul produce hormoni de natură steroidică, corticoizii. Medulara elaborează substanțe denumite catecolamine.

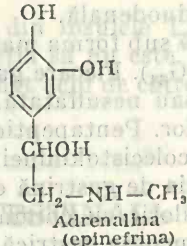
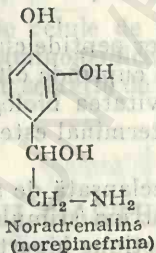
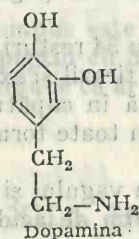
Medulara împreună cu sistemul nervos parasimpatic și simpatic alcătuiesc un sistem neuroendocrin — simpatoadrenal — cu rol în adaptarea organismului la diverse solicitări, acute sau cronice.

Medulara poate fi considerată o parte a sistemului nervos simpatic, un ganglion care și-a pierdut terminațiile axonale. Producții elaborați de medulară — catecolamine — sînt eliberați direct în sînge.

Medulara este alcătuită din celule denumite cromafine (sau feocromocite) datorită proprietăților lor tinctoriale. Cu acid cronic se colorează în brun, datorită oxidării catecolaminelor la melanine. Celulele cromafine au o origine embriologică comună cu celulele ganglionare ale sistemului nervos simpatic. Grupuri de celule cromafine se găsesc și în lungul sistemului nervos simpatic din plămîn, ficat, intestin etc. (celule cromafine ectopice).

Medulosuprarenala este inervată de fibre preganglionare ale sistemului nervos simpatic, fibre colinergice. Vascularizația se face printr-un sistem vascular portal ce se formează din capilarele din cortex. În acest sistem glucocorticoizii ating concentrații mult mai ridicate decît în circulația sistemică.

**Structura chimică a catecolaminelor.** Medulosuprarenala elaborează compuși denumiți catecolamine (cuprind nucleul catecolului, 1,2-dihidroxibenzen): dopamină, noradrenalină (norepinefrină) și adrenalină (epinefrină):



Medulosuprarenala eliberează în sînge adrenalină (80% din secreția totală) și noradrenalină (20%). Noradrenalină îndeplinește și funcția de neurotransmițător la nivelul terminațiilor nervilor postganglionari simpatici (terminații adrenergice) și sîngele cuprinde o fracțiune din noradrenalină eliberată pe această cale, cea care nu a fost recaptată imediat la nivelul sinapselor.

Celulele cromafine ectopice cuprind noradrenalină fie sintetizată in situ, fie captată din sînge. Adrenalină nu este sintetizată în celulele cromafine extramedulare dar poate fi prezentă în aceste celule prin captare din plasmă.

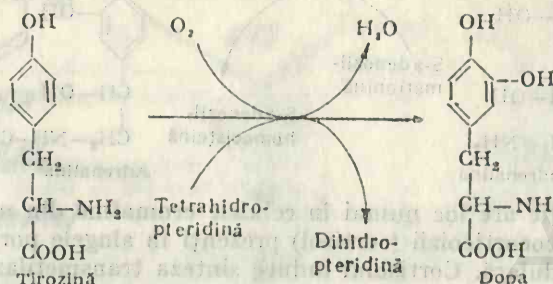
Dopamina este absentă în sînge, se găsește în anumite regiuni ale sistemului nervos central. Are rol de neurotransmițător la nivelul unor terminații nervoase (dopaminergice).

### Biosintează

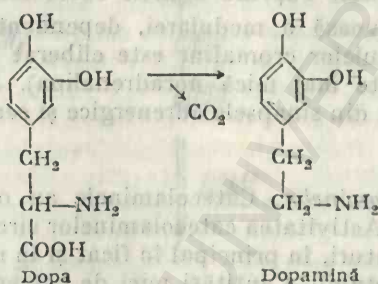
Catecolaminele sînt sintetizate pornindu-se de la tirozină. Aceasta rezultă prin hidroliza proteinelor endo- sau exogene sau prin hidroxilarea fenilalaninei, aminoacid esențial.



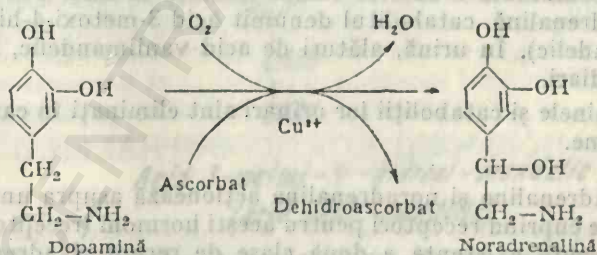
Prima reacție a acestei căi biosintetice constă în hidroxilarea tirozinei la dopa (dihidroxi-fenilalanină) sub acțiunea unei tirozin-hidroxilaze (o mono-oxigenază) :



Etapă a doua constă în decarboxilarea dopa la dopamină, într-o reacție la care participă piridoxal-fosfatul :



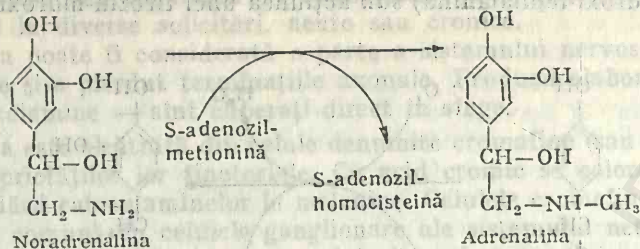
Urmează o nouă hidroxilare, la nivelul catenei laterale sub acțiunea unei hidroxilaze dependentă de ascorbat și ioni de cupru ca sistem redox auxiliar :



Această reacție, și singura, are loc în granulele cromafine, enzima fiind localizată pe suprafața internă a acestor granule. Dopamina pătrunde din citosol în granule, este transformată în noradrenalină și aceasta din urmă, pentru a fi transformată mai departe în adrenalină, este eliberată din nou în citosol.

Trecerea noradrenalinei în adrenalină constă într-o reacție de metilare sub acțiunea unei metil-transferaze (fenil-etanol-amin-N-metil-transferază) citosolice.

Donorul de grupări metil este S-adenozil-metionina :



Această reacție are loc numai în celulele cromafine din medulară și este controlată de glucocorticoizii (cortisol) prezenți în singele portal care ajunge din cortex în medulară. Cortisolul induce sinteza transmetilazei.

**Depozitare și secreție.** Celulele medulosuprarenale cuprind noradrenalină și adrenalină depozitate împreună cu ATP-Mg<sup>2+</sup>, ioni de Ca<sup>2+</sup> și o proteină specifică cromogranină în granule (cromafine). Unele granule cuprind adrenalină, altele noradrenalină și altele cuprind ambele catecolamine.

Prin stimularea nervoasă a medularei, dependentă de influxul ionilor de Ca<sup>2+</sup>, conținutul granulelor cromafine este eliberat în singe (în principal adrenalina și în cantitate mai mică noradrenalină). Singele mai cuprinde noradrenalină ce a scăpat din sinapsele adrenergice și cea eliberată din celulele cromafine ectopice.

**Metabolismul catecolaminelor.** Catecolaminele au o viață foarte scurtă, t 1/2 de 10—30 secunde. Activitatea catecolaminelor circulante este întreruptă rapid prin captare în țesuturi, în principal în ficat și în rinichi, și metabolizare la compuși inactivi excretabili. Cantități mici de catecolamine sunt eliminate ca atare pe cale renală.

Catabolismul catecolaminelor are loc cu participarea a două enzime, catecol-O-metil transferază (COMT) și monoaminoxidază (MAO) (fig. XII.18). Sub acțiunea combinată a acestor enzime rezultă în final atât din adrenalină cât și din noradrenalină, catabolitul denumit acid 3-metoxi-4-hidroxi-mandelic (acid vanilmandelic). În urină, alături de acid vanilmandelic, se află și cataboliți intermediari.

Catecolaminele și cataboliții lor urinari sunt eliminați în cantitate mare în feocromocitoame.

**Acțiuni.** Adrenalină și noradrenalină acționează asupra unui număr mare de țesuturi care cuprind receptori pentru acești hormoni (receptori adrenergici). A fost recunoscută existența a două clase de receptori adrenergici, α și β, fiecare clasă fiind alcătuită din subclasele α<sub>1</sub> și α<sub>2</sub>, respectiv, β<sub>1</sub> și β<sub>2</sub>. Acești receptori sunt cuplați cu sisteme mesageriale secundare diferite și răspunsul unui țesut la catecolamine va depinde de natura receptorilor adrenergici pe care îi posedă, ca și de natura sistemelor efectoare proprii fiecărui tip de celulă.

Receptorii β<sub>1</sub> și β<sub>2</sub> sunt cuplați cu adenilat-ciclază prin intermediul proteinei G<sub>s</sub>, cu acțiune stimulatorie și ocuparea acestor receptori va duce la creșterea concentrației intracelulare a AMP<sub>c</sub>; receptorii α<sub>2</sub> cuplați cu proteina G<sub>i</sub>,



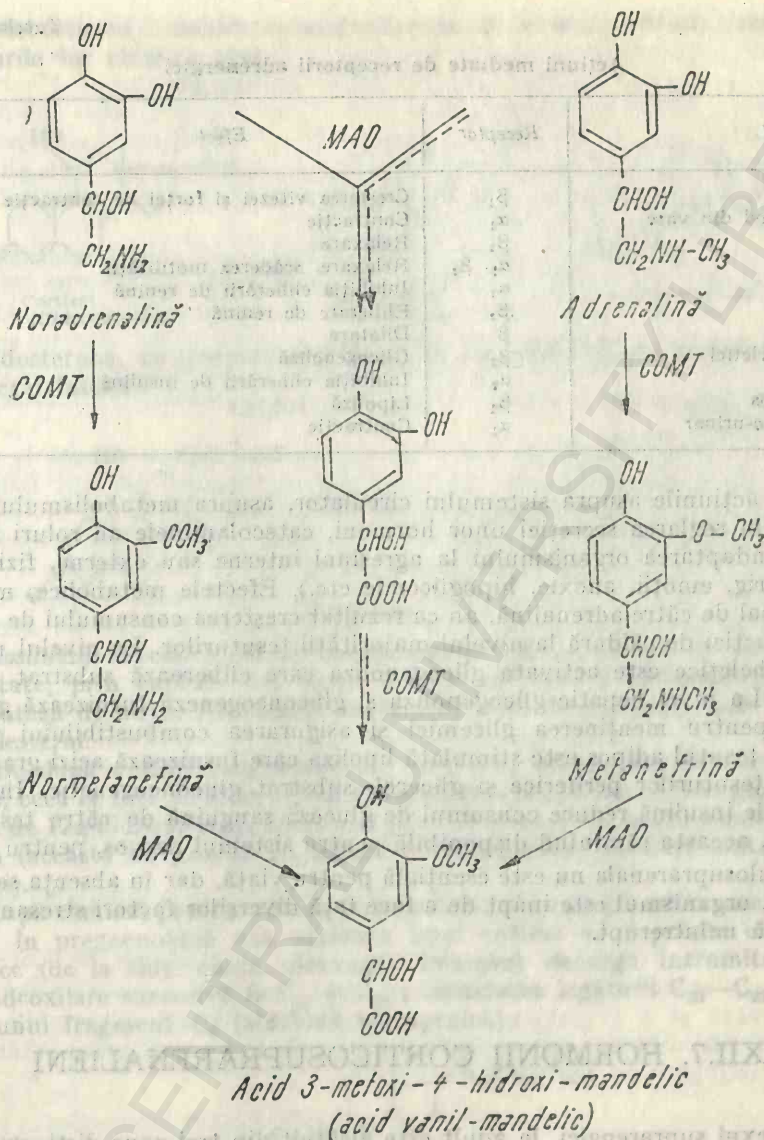


Fig. XII.18 — Catabolismul catecolaminelor; COMT = catecol-orto-metil-transferază; MAO = monoamin-oxidază.

inhibă adenilat-ciclaza iar efectele mediate de acești receptori corespund unei scăderi a concentrației AMP. Ocuparea receptorilor  $\alpha_1$  determină o creștere a concentrației calciului intracelular, fie prin influx din spațiul extracelular, fie prin eliberare din depozitele intracelulare (mediată de inozitol trifosfat). În tabelul XII.6 sînt arătate efectele produse de catecolamine în diverse țesuturi și natura receptorilor care mediază aceste efecte.

Acțiuni mediate de receptorii adrenergici

Țesut	Receptor	Efect
Miocard	$\beta_1$	Creșterea vitezei și forței de contracție
Mușchi neted din vase	$\alpha_1$	Contractie
	$\beta_2$	Relaxare
Intestin	$\alpha_2, \beta_2$	Relaxare, scăderea motilității
Rinichi	$\alpha_2$	Inhibiția eliberării de renină
	$\beta_2$	Eliberare de renină
Bronhiole	$\beta$	Dilatare
Mușchi scheletici	$\beta_2$	Glicogenoliză
Pancreas	$\alpha_2$	Inhibiția eliberării de insulină
Țesut adipos	$\beta_1$	Lipoliză
Tract genito-urinar	$\alpha_1$	Contractie

Prin acțiunile asupra sistemului circulator, asupra metabolismului energogen, prin reglarea secreției unor hormoni, catecolaminele au roluri importante în adaptarea organismului la agresiuni interne sau externe, fizice sau psihice (frig, emoții, anoxie, hipoglicemie etc.). Efectele metabolice, mediate în principal de către adrenalină, au ca rezultat creșterea consumului de oxigen și a producției de căldură la nivelul majorității țesuturilor. La nivelul musculaturii scheletice este activată glicogenoliza care eliberează substrat pentru glicoliză. La nivel hepatic glicogenoliza și gluconeogeneza furnizează glucoză singelui pentru menținerea glicemiei și asigurarea combustibilului pentru creier. În țesutul adipos este stimulată lipoliza care furnizează acizi grași pentru uzul țesuturilor periferice și glicerol, substrat gluconeogenetic. Inhibiția secreției de insulină reduce consumul de glucoză sanguină de către țesuturile periferice, aceasta rămânând disponibilă pentru sistemul nervos, pentru creier.

Medulosuprarenala nu este esențială pentru viață, dar în absența secreției medulare, organismul este inapt de a face față diversilor factori stresanți care acționează neîntrerupt.

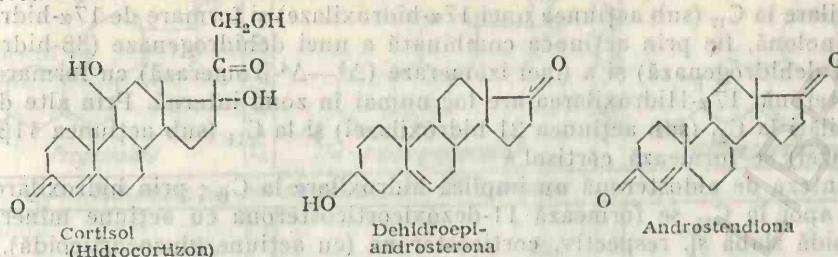
## XII.7. HORMONII CORTICOSUPRARENALIENI

Cortexul suprarenalei, la adult este alcătuit din trei zone distincte histologic, un strat exterior (zona glomerulosa), unul median (zona fasciculată) și unul intern (zona reticularis). Zona glomerulosa este producătoare de mineralocorticoizi, zona fasciculată (cea mai dezvoltată la om) și zona reticularis produc glucocorticoizi și androgeni. Zona externă și cele două zone interne se comportă ca două unități separate prin produsele secretate și prin mecanismele reglatorii.

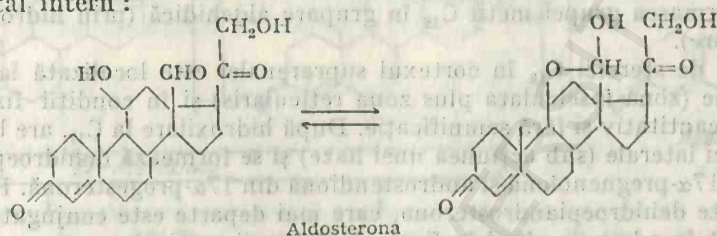
**Structură.** Hormonii corticali sînt steroizi (corticosteroizi)  $C_{21}$  (mineralo- și glucocorticoizi) și  $C_{19}$  (androgeni). În cortexul suprarenalei se află un număr mare de steroizi, dar aceia care sînt secretați în cantități suficiente pentru a exercita acțiuni hormonale sînt: cortisolul (glucocorticoid), aldosterona



(mineralocorticoid), dehidroepiandrosterona și androstendiona (androgeni).  
Structurile lor chimice sînt:



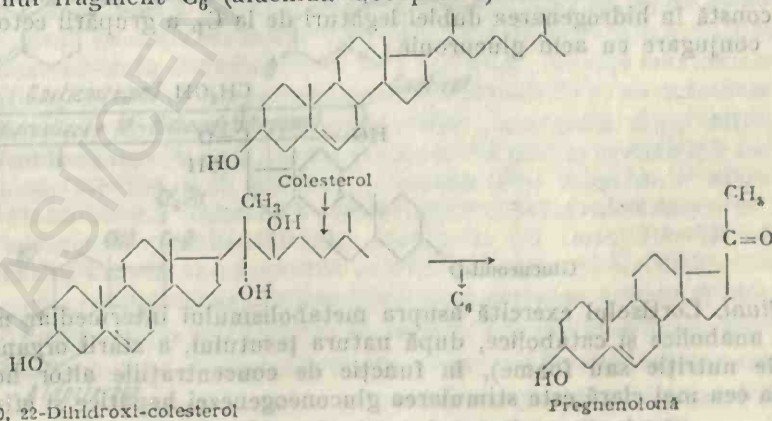
Aldosterona, cu grupare aldehydică la  $C_{13}$  poate exista și sub formă de semiacetal intern:



**Biosinteză.** Precursorul corticosteroizilor este colesterolul obținut, în majoritate, prin captare din lipoproteinele plasmatic (β-lipoproteine) sau prin sinteză de novo. Adrenalele cuprind rezerve de colesterol sub formă de acil-colesterol.

Cele două unități funcționale ale corticalei diferă prin distribuția unor enzime, ceea ce face ca aldosterona să fie sintetizată numai în zona glomerulosa (lipsită de 17α-hidroxilază); cortisolul și androgenii se formează numai în zona internă (aceasta nu posedă 18-hidroxi-dehidrogenaza, necesară sintezei aldosteronei).

Etapa comună pentru sinteza corticosteroizilor este transformarea colesterolului în pregnenolonă sub acțiunea unei enzime ce cuprinde citocromul P-450scc (de la side chain cleavage). Procesul decurge intramitochondrial prin hidroxilare succesivă la  $C_{22}$  și  $C_{20}$  și scindarea legăturii  $C_{20}-C_{22}$  și eliberarea unui fragment  $C_6$  (aldehidă izocaproică):



20, 22-Dihidroxi-colesterol

(În fig. XII.19 sînt arătate reacțiile care transformă pregnenolona în aldosteronă, cortisol și androgeni. Calea care duce la cortisol începe fie prin hidroxilare la C<sub>17</sub> (sub acțiunea unei 17 $\alpha$ -hidroxilaze) și formare de 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolonă, fie prin acțiunea combinată a unei dehidrogenaze (3 $\beta$ -hidroxisteroid dehidrogenază) și a unei izomeraze ( $\Delta^5$ — $\Delta^4$ -izomerază), cu formare de progesteronă. 17 $\alpha$ -Hidroxilarea are loc numai în zonă internă. Prin alte două hidroxilări la C<sub>21</sub> (sub acțiunea 21-hidroxilazei) și la C<sub>11</sub> (sub acțiunea 11 $\beta$ -hidroxilazei) se formează cortisol.

Sinteza de aldosteronă nu implică hidroxilare la C<sub>17</sub>; prin hidroxilare la C<sub>21</sub> și apoi la C<sub>11</sub> se formează 11-dezoxicorticosterona cu acțiune mineralocorticoidă slabă și, respectiv, corticosterona (cu acțiune glucocorticoidă). La rozătoare, corticosterona este hormonul glucocorticoid major. Reacția specifică pentru formarea aldosteronei, localizată la nivelul zonei externe a cortexului, este transformarea grupei metil C<sub>18</sub> în grupare aldehidică (prin hidroxilare și dehidrogenare).

Sinteza de steroizi C<sub>19</sub> în cortexul suprarenalei este localizată la nivelul zonei interne (zona fasciculată plus zona reticularis) și în condiții fiziologice este redusă cantitativ și fără semnificație. După hidroxilare la C<sub>17</sub>, are loc detașarea catenei laterale (sub acțiunea unei liaze) și se formează dehidroepiandrosteronă din 17 $\alpha$ -pregnenolonă și androstendionă din 17 $\alpha$ -progesteronă. Produsul principal este dehidroepiandrosterona, care mai departe este conjugat cu acid sulfuric, atît în adenale cît și în ficat. Androgenii corticali nu au activitate hormonală ca atare, ci după transformare în testosteronă și dihidrotestosteronă în țesuturi țintă.

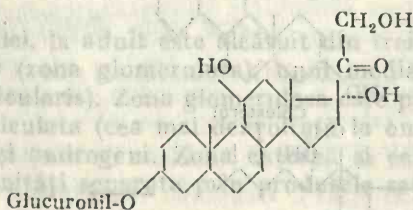
**Secreție și transport.** Corticosteroizii nu sînt depozitați în celulă, ei sînt secretați imediat după sinteză. În sînge circulă fixați pe proteine transportoare specifice sau pe serumalbumină. Frațiunea liberă este cea activă biologic.

Cortisolul este transportat în condiții bazale, în proporție de aproximativ 70% de transcortină sau CBP (cortisol-binding protein). Serumalbumina leagă cu afinitate mică aproximativ 15% din cortisolul plasmatic.

Aldosterona și androgenii corticali sînt fixați pe serumalbumină care are afinitate mică dar capacitate mare de legare.

**Metabolism.** Timpul de înjumătățire pentru cortisol este de 1,5—2 ore.

Corticosteroizii sînt catabolizați printr-o varietate mare de reacții care îi inactivează și îi transformă în compuși hidrosolubili, excretabili. Calea majoră constă în hidrogenarea dublei legături de la C<sub>4</sub>, a grupării cetonice de la C<sub>3</sub> și conjugare cu acid glucuronic:



**Acțiuni.** Cortisolul exercită asupra metabolismului intermediar multiple acțiuni, anabolice și catabolice, după natura țesutului, a stării organismului (stare de nutriție sau foame), în funcție de concentrațiile altor hormoni. Acțiunea cea mai clară este stimularea gluconeogenezei hepatice și efluxul de



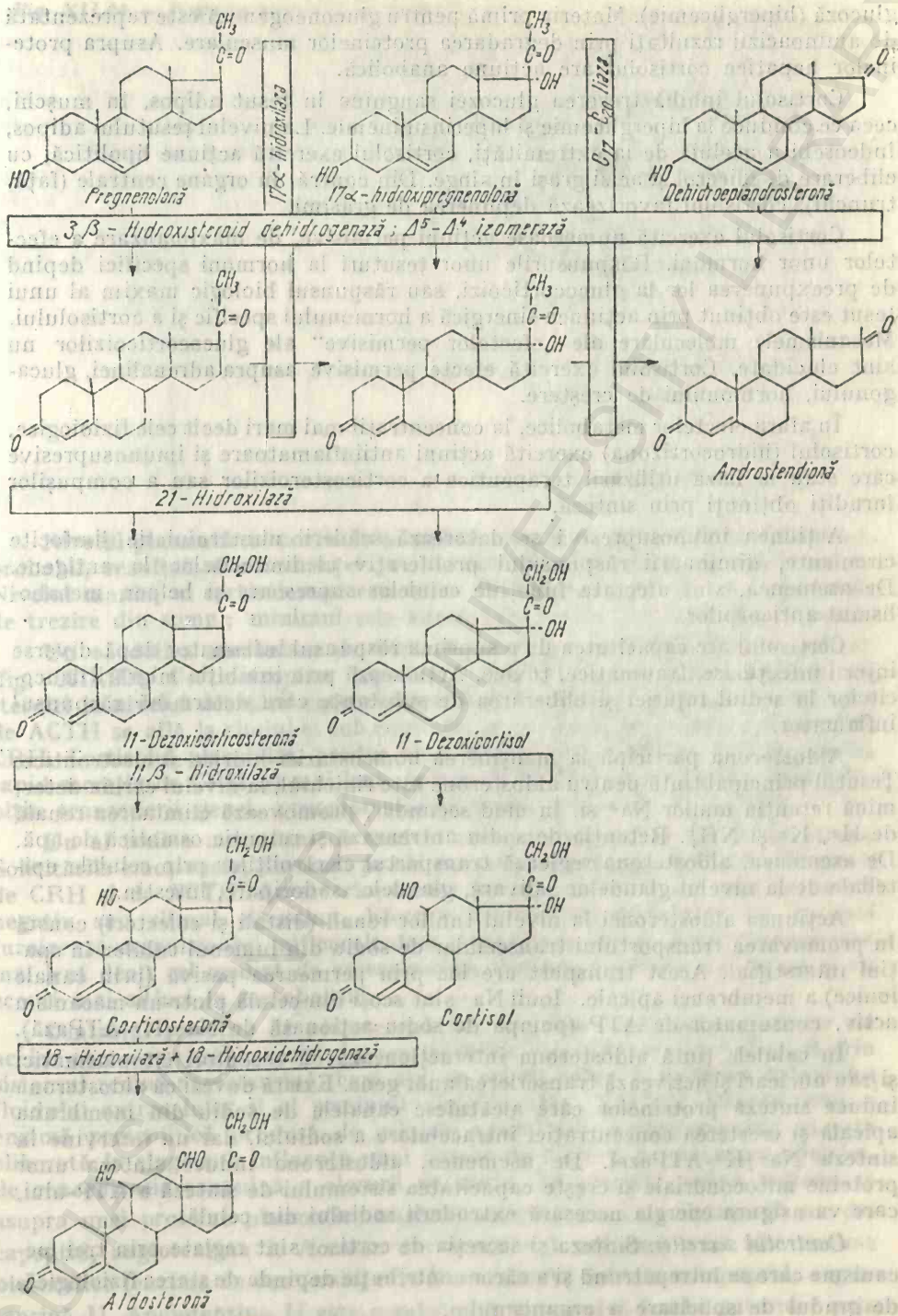


Fig. XII.19 — Biosinteza hormonilor corticosteroizi.

glucoză (hiperglicemie). Materia primă pentru gluconeogeneză este reprezentată de aminoacizii rezultați prin degradarea proteinelor musculare. Asupra proteinelor hepatice cortisolul are acțiune anabolică.

Cortisolul inhibă trecerea glucozei sanguine în țesut adipos, în mușchi, ceea ce conduce la hiperglicemie și hiperinsulinemie. La nivelul țesutului adipos, îndeosebi a celui al extremității, cortisolul exercită acțiune lipolitică, cu eliberare de glicerol și acizi grași în sânge. Din contră, în organe centrale (față, trunchi), cortisolul favorizează depunerea de grăsimi.

Cortisolul exercită numeroase acțiuni permissive, de maximalizare a efectelor unor hormoni. Răspunsurile unor țesuturi la hormoni specifici depind de preexpunerea lor la glucocorticoizi, sau răspunsul biologic maxim al unui țesut este obținut prin acțiunea sinergică a hormonului specific și a cortisolului. Mecanismele moleculare ale „efectelor permissive” ale glucocorticoizilor nu sînt elucidate. Cortisolul exercită efecte permissive asupra adrenalinei, glucagonului, hormonului de creștere.

În afara efectelor metabolice, la concentrații mai mari decît cele fiziologice, cortisolul (hidrocortizonă) exercită acțiuni antiinflamatoare și imunosupresive care stau la baza utilizării terapeutice a corticosteroizilor sau a compușilor înrudiți obținuți prin sinteză.

Acțiunea imunosupresivă se datorează scăderii numărului de limfocite circulante, diminuării răspunsului proliferativ al limfocitelor la antigene. De asemenea, sînt afectate funcțiile celulelor supresoare și helper, metabolismul anticorpilor.

Cortisolul are capacitatea de a suprima răspunsul inflamator după diverse injurii infecțioase, traumatice, toxice. Acționează prin inhibiția migrării leucocitelor la sediul injuriei și eliberarea de substanțe care determină răspunsul inflamator.

Aldosterona participă la menținerea homeostaziei hidrice și electrolitice. Țesutul principal țintă pentru aldosteronă este rinichiul, la nivelul căruia determină retenția ionilor  $\text{Na}^+$  și, în mod secundar, promovează eliminarea renală de  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$  și  $\text{NH}_4^+$ . Retenția de sodiu antrenează și retenție osmotică de apă. De asemenea, aldosterona reglează transportul electrolitilor prin celulele epiteliale de la nivelul glandelor salivare, glandelor sudoripare, intestin.

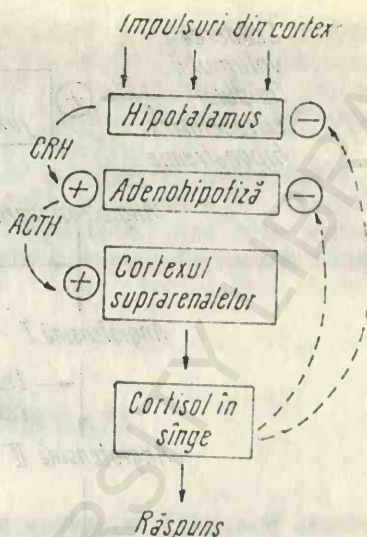
Acțiunea aldosteronei la nivelul tubilor renali (distali și colectori) constă în promovarea transportului transecular de sodiu din lumenul tubilor în spațiul interstițial. Acest transport are loc prin permearea pasivă (prin canale ionice) a membranei apicale. Ionii  $\text{Na}^+$  sînt scoși din celulă pînă într-un mecanism activ, consumator de ATP (pompa de sodiu acționată de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPază).

În celulele țintă aldosterona interacționează cu receptori citoplasmatici și/sau nucleari și activează transcrierea unor gene. Există dovezi că aldosterona induce sinteza proteinelor care alcătuiesc canalele de sodiu din membrana apicală și creșterea concentrației intracelulare a sodiului, dar nu intervine în sinteza  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPazei. De asemenea, aldosterona induce sinteza unor proteine mitocondriale și crește capacitatea sistemului de sinteză a ATP-ului, care va asigura energia necesară extrudării sodiului din celulă.

*Controlul secreției.* Sinteza și secreția de cortisol sînt reglate prin trei mecanisme care se întrepătrund și a căror contribuție depinde de starea fiziologică, de gradul de solicitare a organismului.



Fig. XII.20 — Reglarea secreției de cortisol.



Nivelul plasmatic al cortisolului suferă o variație diurnă (ritm circadian), probabil, rezultat al alternanței perioadelor de alimentare, de veghe-somn. Nivelul maxim al cortisolemiei este atins în intervalul 6—8 a.m., perioada de trezire din somn; minimul este situat spre seară (în jurul orei 6 p.m.).

Un al doilea mecanism de control cuprinde axul hipotalamohipofizar (fig. XII.20). Corticotropina hipofizară (ACTH) controlează sinteza de steroizi la nivelul detașării catenei laterale și formării pregnenolonei. Secreția de ACTH se află la rîndul ei sub controlul hormonului hipotalamic eliberator, CRH. Cortisolul plasmatic, produs al stimulării prin CRH și ACTH, inhibă rapid secreția de CRH, și mai lent, pe cea de ACTH (se presupune prin inhibiția transcrierii genei, proopiomelanocortinei, precursor al ACTH).

Un al treilea mecanism de control este operațional în stările de stress. Solicitățile emoționale, durerea, pe căi nervoase superioare mediază eliberarea de CRH și de ACTH. Aceste răspunsuri pot depăși controlul prin feedback negativ sau ritmul circadian. Efectele metabolice declanșate de cortisol furnizează organismului mijloacele de a răspunde la stress. Acest răspuns este mai lent decît cel mediat de catecolamine, dar are o durată mai lungă și cu ecouri mai adînci în metabolism.

Controlul secreției de aldosteronă are loc prin mecanisme distincte de acelea care operează în cazul glucocorticoizilor. Acest control se realizează prin sistemul renină-angiotensină, care are un rol deosebit în reglarea volumului fluidului extracelular și al presiunii sîngelui (fig. XII.21). Renina este o enzimă proteolitică produsă de celulele aparatului juxtaglomerular și este eliberată în singe sub influența unui număr de factori, de presiunea sîngelui, de concentrația sanguină a clorurii de sodiu. În plasmă, renina acționează asupra unei proteine plasmatice angiotensinogen, din care detașează un decapeptid, angiotensina I. Aceasta din urmă, sub acțiunea unei alte enzime plasmatice (enzimă de conversie) este transformată într-un octapeptid, angiotensina II. Angiotensina II este o substanță vasoactivă foarte puternică prin

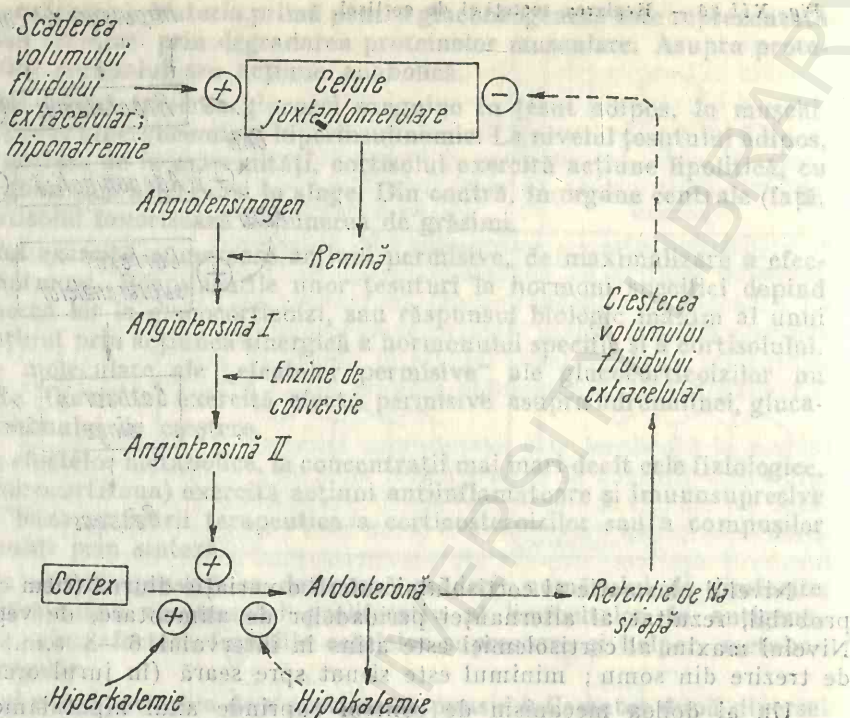


Fig. XII.21 — Reglarea secreției de aldosteronă.

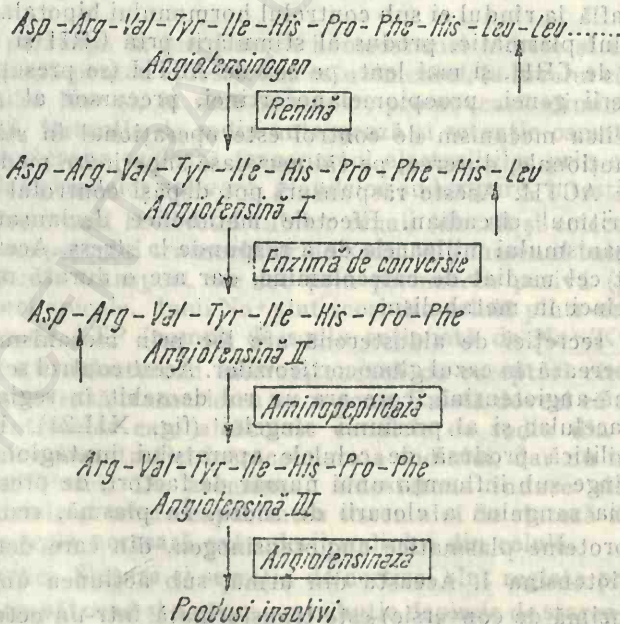


Fig. XII.22 — Formarea angiotensinei II.



constricția arteriolelor. La nivelul zonei glomerulosa, angiotensina II determină eliberarea aldosteronei. Creșterea nivelului plasmatic al aldosteronei determină retenție de sodiu și secundar creșterea volumului și a presiunii singelui. Timpul de acțiune al angiotensinei II este foarte scurt, este degradată rapid sub acțiunea angiotensinazei (fig. XII.22).

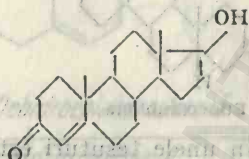
Un alt mecanism de control al secreției de aldosteronă, independent de sistemul renină-angiotensină, operează prin concentrația ionilor  $K^+$ . O ușoară creștere a kalemiei stimulează secreția de aldosteronă, care prin acțiune kaliurică va restabili valoarea kalemiei. Scăderea kalemiei, din contră, inhibă secreția de aldosteronă.

## XII.8. HORMONII SEXUALI

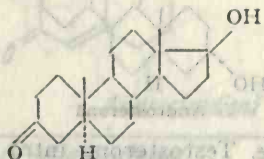
Hormonii testiculari poartă denumirea de androgeni. Hormonii ovarieni sînt estrogenii și progestinele. Hormonii sexuali sînt hormoni steroizi.

### XII.8.1. ANDROGENII

Androgenii, hormonii sexuali masculini, sînt sintetizați în celulele interstițiale (celule Leydig) din testicul. Principalul hormon androgen testicular este testosterona; testiculul mai secretă cantități mici de dihidrotestosteronă. Acesta din urmă se formează și în țesuturile țintă, din testosterona circulantă. Testosterona și dihidrotestosterona sînt steroizi  $C_{19}$  și au formulele :

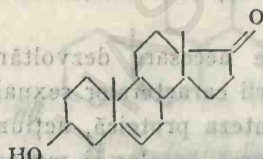


Testosteronă

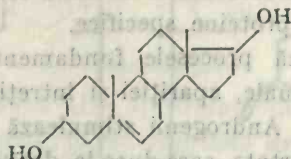


Dihidrotestosteronă

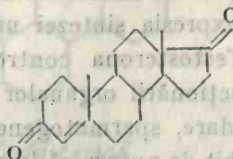
Alți steroizi  $C_{19}$  produși de cortexul suprarenalei, intermediari în sinteza testosteronei în testicul sau rezultați prin transformări periferice a hormonilor circulanți au activitate androgenică mai mare sau mai mică. Acestea sînt dehidroepiandrosterona,  $\Delta^5$ -androstendiol și androstendionă :



Dehidroepiandrosterona

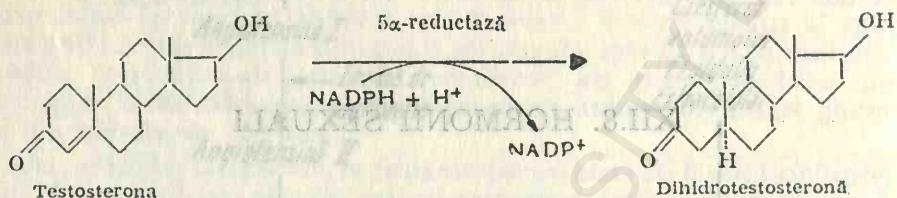


$\Delta^5$ -Androstendiol



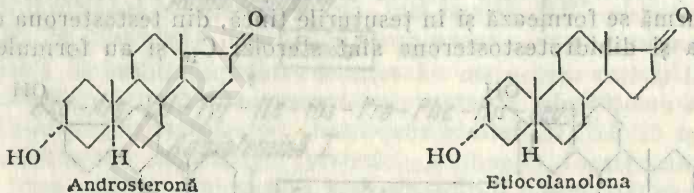
Androstendionă

La om calea majoră de formare a testosteronului trece prin progesteronă. Dihidrotestosteronul se formează în testicul sau țesuturi periferice prin acțiunea unei  $5\alpha$ -reductaze NADPH-dependente:



**Secreție și transport.** Hormonul este eliberat în sînge pe măsură ce se formează; nu există forme de depozitare. Transportul plasmatic este efectuat de o proteină care leagă atât testosterona cît și estrogenii — SHBG (sex hormone-binding globulin) sau TEBG (testosterone-estrogen-binding globulin). Proteina are afinitate mai mare pentru testosteronă decît pentru estrogeni. SHBG este sintetizată în ficat și producția ei este influențată de o serie de factori. Estrogenii cresc sinteza acestei proteine, hormonii tiroidieni o scad.

**Metabolism.** Testosterona este catabolizată rapid, în ficat și alte țesuturi, la produși inactivi sau cu activitate androgenă slabă. Principalii cataboliți urinari ai testosteronei sînt androsterona și etiolanolona (17-cetosteroizi), eliminați sub formă de sulfo- sau glucuronoconjugati:



**Acțiune.** Testosterona intră liber în celule. În unele țesuturi este transformată în dihidrotestosteronă. Acești doi hormoni interacționează cu același tip de receptori intracelulari, dihidrotestosterona avînd afinitate mai mare decît testosterona. Complexul hormon-receptor interacționează cu cromatina și activează transcrierea unor gene. Proteinele sintetizate mediază efectele biologice ale hormonului. Nu este cunoscut dacă toate acțiunile testosteronului sînt expresia sintezei unor proteine specifice.

Testosterona controlează procesele fundamentale necesare dezvoltării și funcționării organelor sexuale, apariției și întreținerii caracterelor sexuale secundare, spermatogenezei. Androgenii stimulează sinteza proteică, acțiune deosebit de puternică la pubertate, care duce la dezvoltarea oaselor și musculaturii scheletice.



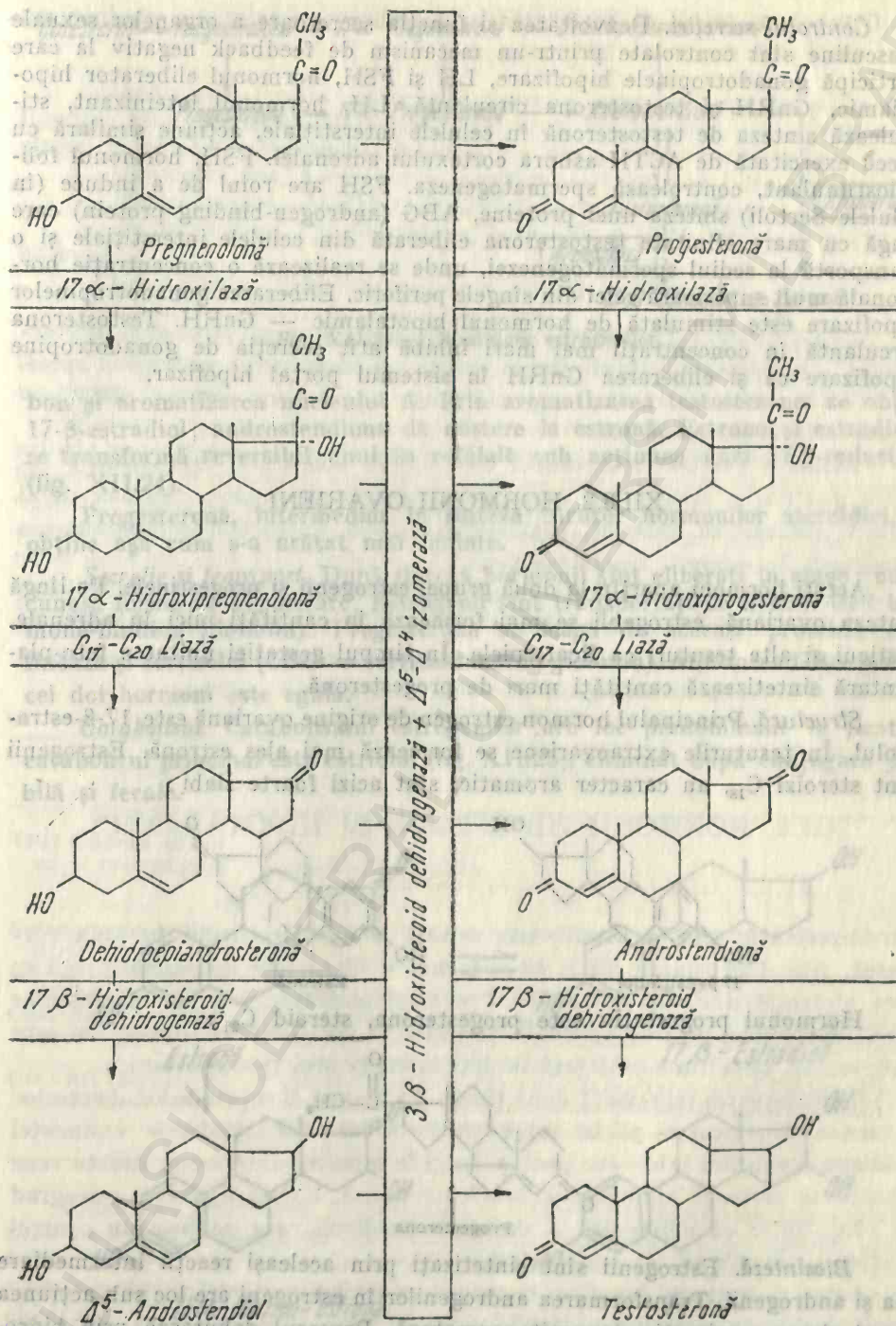


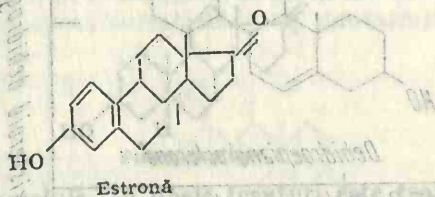
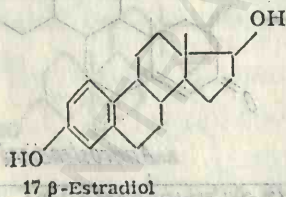
Fig. XII.23 — Biosinteza testosteronci.

**Controlul secreției.** Dezvoltarea și funcția secretoare a organelor sexuale masculine sînt controlate printr-un mecanism de feedback negativ la care participă gonadotropinele hipofizare, LH și FSH, hormonul eliberator hipotalamic, GnRH și testosterona circulantă. LH, hormonul luteinizant, stimulează sinteza de testosteronă în celulele interstițiale, acțiune similară cu aceea exercitată de ACTH asupra cortexului adrenalei. FSH, hormonul foliculostimulant, controlează spermatogeneza. FSH are rolul de a induce (în celulele Sertoli) sinteza unei proteine, ABG (androgen-binding protein) care leagă cu mare afinitate testosterona eliberată din celulele interstițiale și o transportă la sediul spermatogenezei, unde se realizează o concentrație hormonală mult superioară celei din singele periferic. Eliberarea gonadotropinelor hipofizare este stimulată de hormonul hipotalamic — GnRH. Testosterona circulantă în concentrații mai mari inhibă atât secreția de gonadotropine hipofizare ca și eliberarea GnRH în sistemul portal hipofizar.

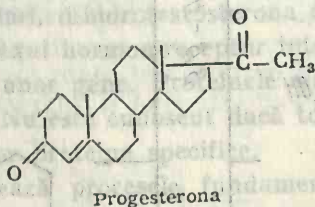
## XII.8.2. HORMONII OVARIENI

Acești hormoni aparțin la două grupe, estrogenii și progestinele. Pe lângă sinteza ovariană, estrogenii se mai formează în cantități mici în adrenale, testicul și alte țesuturi ca ficat, piele. În timpul gestației unitatea feto-placentară sintetizează cantități mari de progesteronă.

**Structură.** Principalul hormon estrogen de origine ovariană este 17- $\beta$ -estradiolul. În țesuturile extraovariene se formează mai ales estronă. Estrogenii sînt steroizi  $C_{18}$ , au caracter aromatic, sînt acizi foarte slabi :

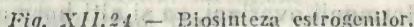


Hormonul progestativ este progesterona, steroid  $C_{21}$  :



**Biosinteză.** Estrogenii sînt sintetizați prin aceleași reacții intermediare ca și androgenii. Transformarea androgenilor în estrogeni are loc sub acțiunea unui sistem enzimatic denumit aromatază. Procesul debutează prin hidroxilare la  $C_{19}$  după care urmează îndepărtarea acestui atom ca dioxid de car-

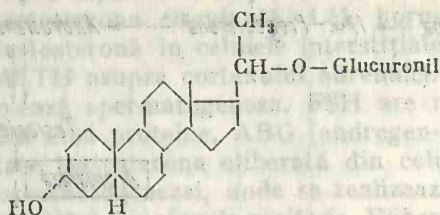




**Catabolism.** Catabolismul estrogenilor are loc predominant în ficat și catabolitul principal este estriolul (fig. XII.25), eliminat după conjugare prin bilă și fecale.

*Fig. XII,25 — Catabolismul estrogenilor.*

Catabolitul principal al progesteronei este pregnandiolul, eliminat pe cale renală sub formă de 20-glucuronid :



**Acțiuni biologice.** Hormonii ovarieni, ca și alți hormoni steroidici, interacționează cu receptori intracelulari și determină transcrierea unor gene specifice. Totuși hormonii ovarieni exercită multe alte acțiuni care nu pot fi explicate prin acest mecanism.

Hormonii ovarieni controlează dezvoltarea aparatului reproducător feminin, apariția și menținerea caracterelor sexuale secundare, reglează ciclul ovarian, fecundarea, gestația, nașterea și lactația. Estrogenii și progesterona acționează fie sinergic, fie antagonist.

**Controlul secreției.** Sinteza și secreția hormonilor ovarieni este reglată de gonadotropinele hipofizare, LH și FSH, de GnRH. LH stimulează producția de estrogeni și progesteronă de către ovar, controlează ciclul ovarian. FSH stimulează secreția de estrogeni, dezvoltarea foliculilor ovarieni.

## XII.9. HORMONII HIPOFIZARI ȘI HIPOTALAMICI

Hipofiza (glanda pituitară) este situată la baza creierului în șaua turcească. Are dimensiunile  $10 \times 13 \times 6$  mm și cântărește aproximativ 0,5 g. Este alcătuită dintr-un lob anterior și altul posterior. Un lob intermediar (pars intermedia) este dezvoltat la majoritatea vertebratelor, dar la om este rudimentar. Hipofiza este legată de hipotalamus prin tija pituitară.

Adenohipofiza reprezintă două treimi din glandă și cuprinde lobul anterior și sistemul vascular portal care se formează din capilarele eminentei mediane și coboară prin vene portale lungi în hipofiza anterioară. Aceste vene transportă hormonii hipotalamici la adenohipofiză. Există și un flux retrograd de sânge între adenohipofiză și eminiența mediană care permite un control feedback adenohipofiză → hipotalamus.

Lobul posterior al hipofizei împreună cu nucleii paraventricular și supra-optic din hipotalamus și conexiunile nervoase între aceste structuri alcătuiesc o unitate funcțională — neurohipofiza.



## XII.9.1. HORMONII ADENOHIPOFIZARI

Adenohipofiza produce și secretă hormoni care reglează dezvoltarea și funcțiile altor glande endocrine (hormoni tropi sau tropine) sau au rol în reglarea proceselor metabolice fundamentale din țesuturi periferice :

- somatotropina, hormonul de creștere, GH (growth hormone);
- corticotropina, ACTH (adrenocorticotropic hormone);
- gonadotropine, LH (luteinizing hormone) și FSH (follicle stimulating hormone);
- tireotropina, TSH (thyroide-stimulating hormone);
- prolactina, PRL, hormonul lactogen.

Adenohipofiza cuprinde cinci tipuri de celule secretorii : celule somatoprote, corticotrope, gonadotrope, tireotrope, lactotrope, fiecare tip secretind un singur hormon.

Funcția adenohipofizei este reglată de către peptide elaborate în diverse arii ale hipotalamusului. Substanțele eliberate de terminațiile fibrelor nervoase hipotalamice în capilarele eminenței mediane sint transportate prin sistemul vascular portal la hipofiză. Hormonii hipotalamici stimulează secreția tropinelor hipofizare și sint denumite RH (releasing hormone) sau inhibă eliberarea acestora, sint RIH (release-inhibiting hormone). Hormonii hipotalamici sint peptide, cuprind între 3 resturi aminoacidice (TRH) și 44 resturi (GnRH). Într-un caz RIH este dopamina (PRL—RIH) (tabelul XII.7).

Tabelul XII.7

Hormonii hipotalamici

Hormon	Secvența aminoacidică
TRH (hormon eliberator al tireotropinei)	$\text{piro-Glu-Ile-ProNH}_2$
Somatostatina-14 (GH—RIH)	$\text{Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys-NH}_2$
Gn—RH (hormon eliberator al Gn)	$\text{piro-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH}_2$
CRH (hormon eliberator al ACTH)	$\text{Ser-Glu-Glu-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Met-Thr-Lys-Ala-Asp-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-Leu-Leu-Asp-Ile-Ala-NH}_2$
GH—RH (hormon eliberator al GH)	$\text{Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-Arg-Ala-Arg-Leu-NH}_2$

Eliberarea hormonilor hipotalamici și a tropinelor hipofizare este reglată prin mecanism feedback de către concentrația plasmatică a hormonilor periferici. Un nivel mai scăzut al hormonului circulant, în conjuncție cu diverși stimuli nervoși, constituie semnalul pentru secreția unui hormon hipotalamic eliberator (RH). Ajuns la hipofiză prin sistemul vascular port, declanșează secreția unei tropine specifice care acționind la nivelul unei glande endocrine

periferice ținută determină modificări trofice și secretorii care au ca rezultat eliberarea în circulație a hormonului. Hormonul periferic, într-o concentrație mai mare, redresează un parametru biologic specific și în același timp inhibă secreția de tropină hipofizară ca și secreția de RH (eventual stimulează eliberarea unui hormon hipotalamic inhibitor, RIH). În unele cazuri funcționează și o buclă scurtă inhibitorie prin circulația sanguină retrogradă între hipofiză și hipotalamus.

Hormonii adenohipofizari sînt de natură peptidică și după înruderile structurale, evolutive și funcționale sînt împărțiți în trei grupe:

- a) grupa corticotropinei, cuprinde peptidele derivate dintr-un precursor comun, pro-opio-melanocortină (grupa POMC);
- b) grupa hormonilor somatomatotropi;
- c) grupa hormonilor glicoproteici.

#### a. Peptide derivate din pro-opiomelanocortină (POMC)

POMC este un polipeptid cuprinzînd aproximativ 250 resturi amino-acidice prin a cărui prelucrare posttraducțională se obțin diverse fragmente cu funcții hormonale, neurotransmițători, neuromodulatori. POMC este sintetizată în lobul anterior al hipofizei (în celule corticotrope), în lobul intermediar (la acele specii la care acest lob este dezvoltat), în creier, placenta, testicul.

Prelucrarea POMC și formarea peptidelor active are loc prin scindări la nivelul unor legături peptidice între aminoacizi bazici (lizina, arginina), recunoscute de o endopeptidază celulară (cu specificitate asemănătoare cu a tripsinei). Fragmentele peptidice sînt în continuare scurtate de la capete sub acțiunea unor exopeptidaze (de regulă carboxipeptidază). Prin alte transformări, metilare, acetilare, amidare etc., activitatea biologică a peptidelor este potențată sau, din contră, diminuată sau anulată.

Prin prelucrarea primară și secundară a POMC rezultă mai multe peptide active (fig. XII.26). Există diferențe între prelucrarea POMC în lobul anterior, în pars intermedia, în țesuturile extrahipofizare și diferențe interspecii. La om, prin prelucrarea POMC în lobul anterior hipofizar se obțin: un fragment N-terminal, un peptid de legătură, ACTH și  $\beta$ -LPH (hormon lipotrop),  $\beta$ -LPH este secretat ca atare sau este scindat mai departe în  $\gamma$ -LPH și  $\beta$ -endorfină. Există dovezi că  $\beta$ -endorfină în lobul anterior hipofizar uman este inactivată prin acetilare.  $\beta$ -Endorfina activă rezultă prin prelucrarea POMC în hipotalamus.

La speciile cu un lob intermediar dezvoltat, prin prelucrarea POMC se formează melanotropina, MSH (hormonul stimulator al melanocitelor).  $\alpha$ -MSH se formează din ACTH,  $\beta$ -MSH din  $\gamma$ -LPH; fragmentul N-terminal formează  $\gamma$ -MSH. Melanotropina are rolul de a dispersa pigmentii melaninici în celulele melanofore determinînd închiderea culorii pielii. Această funcție este amplu dezvoltată la amfibieni la care schimbarea culorii tegumentului este un mecanism de apărare. MSH mai are roluri, puțin înțelese, în comportament, în funcția testiculară.



# Polipeptid cu aproximativ 250 resturi aminoacidice

## Pro-opiomelanocortina

Enzime de conversie (endopeptidază  
tripsin-like, carboxipeptidaze).

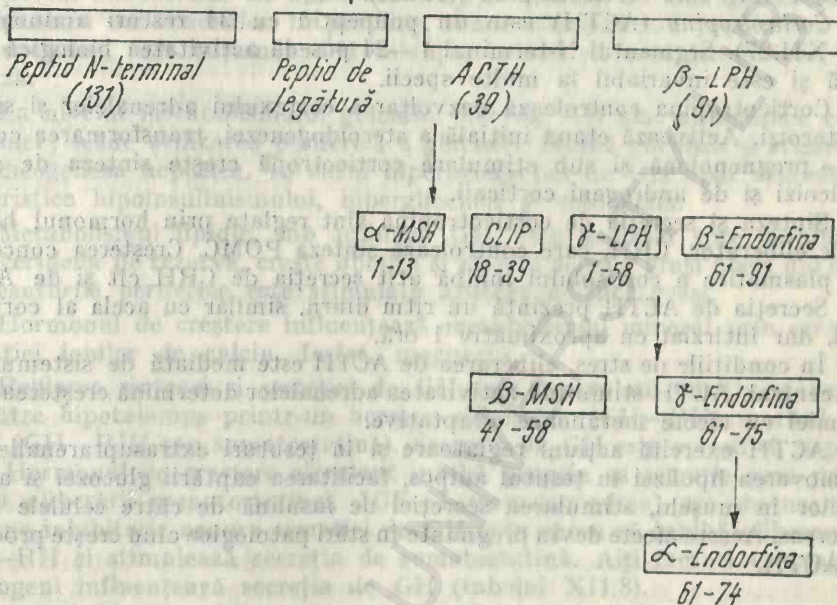


Fig. XII.26 — Peptide (active) obținute prin prelucrarea pro-opiomelanocortinei (POMC); MSH = hormon stimulator al melanocitelor; ACTH = hormon adrenocorticotrop; LPH = hormon lipotrop, lipotropină; CLIP = corticotropinlike intermediate lobe peptide.

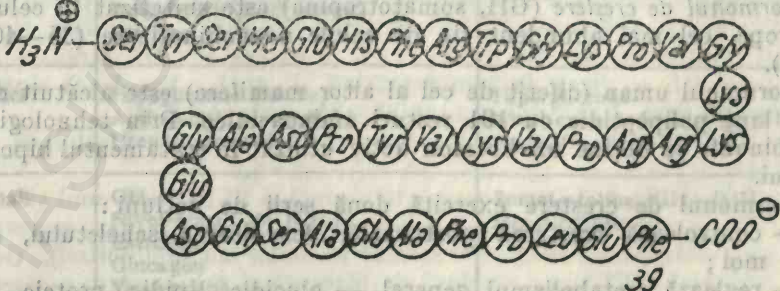


Fig. XII.27 — Structura ACTH (corticotropină).

La om, funcțiile MSH aparțin probabil ACTH și  $\gamma$ -LPH care cuprind secvențele aminoacidice corespunzătoare, ACTH<sub>1-13</sub> corespunde  $\alpha$ -MSH și  $\gamma$ -LPH<sub>41-58</sub> corespunde  $\beta$ -MSH.

Peptidul N-terminal, secretat împreună cu ACTH, ar avea rol în potențarea activității steroidogenetice a ACTH.

Principalul peptid care se formează în adenohipofiza umană prin prelucrarea POMC este corticotropina (ACTH).

Corticotropina (ACTH) este un polipeptid cu 34 resturi aminoacidice (fig. XII.27). Segmentul N-terminal 1—24 posedă activitatea biologică completă și este invariabil la multe specii.

Corticotropina controlează dezvoltarea cortexului adrenalelor și sinteza de steroizi. Activează etapa inițială a steroidogenezei, transformarea colesterol  $\rightarrow$  pregnenolonă și sub stimularea corticotropă crește sinteza de glucocorticoizi și de androgeni corticali.

Sinteza și secreția de corticotropină sînt reglate prin hormonul hipotalamic eliberator, CRH, care controlează sinteza POMC. Creșterea concentrației plasmatică a cortisolului inhibă atât secreția de CRH cit și de ACTH.

Secreția de ACTH prezintă un ritm diurn, similar cu acela al cortisolemiei, dar întîrziat cu aproximativ 1 oră.

În condițiile de stres, eliberarea de ACTH este mediată de sistemul nervos central. ACTH stimulînd activitatea adrenalelor determină creșterea cortisolemiei cu efecte metabolice adaptative.

ACTH exercită acțiuni reglatoare și în țesuturi extrasuprarenaliene ca promovarea lipolizei în țesutul adipos, facilitarea captării glucozei și aminoacizilor în mușchi, stimularea secreției de insulină de către celulele B din pancreas. Aceste efecte devin pregnante în stări patologice cînd crește producția de ACTH.

#### b. Grupul hormonilor somatomotropi

Acest grup cuprinde hormonul de creștere (GH = growth hormone, somatotropina) și prolactina (PRL sau hormonul lactogen) hipofizare. Un peptid cu structură asemănătoare acestora este elaborat de placentă, somatomotropina corionică (CS sau hormon lactogen placentar).

Acești hormoni polipeptidici cuprind 191 resturi aminoacidice (GH și CS) și, respectiv, 199 (PRL). Între GH și CS există omologie structurală în proporție de 85 %, iar între PRL și GH omologia este de numai 13 %.

Hormonul de creștere (GH, somatotropina) este sintetizat în celulele somatotrope, cel mai abundent tip de celule adenohipofizare (35—40 % din glandă).

Hormonul uman (diferit de cel al altor mamifere) este alcătuit dintr-un singur lanț polipeptidic cu 191 resturi aminoacidice. Prin tehnologia ADN recombinant, se obține un hormon activ utilizat în tratamentul hipopituitarismului.

Hormonul de creștere exercită două serii de acțiuni:

- controlează creșterea postnatală, dezvoltarea scheletului, a țesuturilor moi;
- reglează metabolismul general — glucidic, lipidic, proteic, mineral la nivelul țesuturilor periferice.



Acțiunea de hormon de creștere este indirectă, este mediată de IGF (IGF = insulinlike growth factor) sau somatomedină. Hormonul de creștere controlează sinteza și eliberarea acestor factori de către ficat și alte țesuturi.

Acțiunile metabolice ale GH converg spre facilitarea proceselor anabolice, biosintetice, prin asigurarea materiilor prime și a surselor energetice.

GH stimulează sinteza proteinelor prin mecanisme multiple: facilitează transportul intracelular de aminoacizi, crește sinteza de ARN<sub>m</sub>, accelerează incorporarea aminoacizilor în proteine, scade catabolismul proteinelor și al aminoacizilor. Sub acțiunea GH bilanțul azotat al organismului se pozitivează.

La nivelul metabolismului glucidic, efectele GH sînt antagonice cu ale insulinei: scade utilizarea periferică a glucozei, inhibă glicoliza și stimulează gluconeogeneza hepatică. În cazul hiperproducției de GH apar semnele caracteristice hipoinsulinismului, hiperglicemia și cetonemia.

Metabolismul lipidic, sub acțiunea GH, este deplasat spre mobilizarea trigliceridelor de rezervă, crește lipoliza și nivelul acizilor grași liberi din sînge. În țesuturile periferice este stimulată arderea acizilor grași.

Hormonul de creștere influențează metabolismul mineral prin creșterea retenției ionilor de calciu, fosfat, magneziu.

Reglarea sintezei și secreției de GH este controlată pozitiv și negativ de către hipotalamus printr-un hormon eliberator (GH—RH) și altul inhibitor (GH—RIH sau somatostatina). Secreția de GH este episodică și pulsatilă. Hormonul de creștere circulă inhibă propria sa secreție prin promovarea eliberării somatostatinei. IGF—I (somatomedină) are de asemenea acțiune inhibitorie asupra secreției de GH prin aceea că inhibă eliberarea de GH—RH și stimulează secreția de somatostatina. Alți factori umorali sau neurogeni influențează secreția de GH (tabelul XII.8).

Tabelul XII.8

Factori care influențează secreția de GH

Factori	Secreția de GH	
	Crescută	Diminuată
Neurali	Somnul Stres (traumatisme, emoții, infecții) Agoniști $\alpha$ -adrenergici Antagoniști $\beta$ -adrenergici L-Dopa	Absența emoțiilor Agoniști $\beta$ -adrenergici Antagoniști $\alpha$ -adrenergici
Metabolici	Hipoglicemie (foame) Aminoacizii plasmatici Uremie crescută	Hiperglicemie Nivel crescut de acizi grași liberi în sînge. Obezitate
Hormonali	GH—RH Nivel scăzut de IGF—I Estrogeni Glucagon Vasopresină	Somatostatina (GH—RIH) Hipotiroidism

*Prolactina* (PRL, hormonul lactogen, mamotropină) este sintetizată, depozitată și secretată de către celulele lactotrope hipofizare (10—25% din total). Este o proteină cu 199 resturi aminoacidice.

Prolactina acționează asupra glandei mamare controlând inițierea și întreținerea lactației. În timpul gestației, sub acțiunea combinată a estrogenilor, progesteronei și a hormonului placentar somatomotrop (CS) are loc dezvoltarea sinilor și a aparatului secretor. Acțiunea lactogenă a prolactinei se manifestă după naștere când scade nivelul estrogenilor și al progesteronei care antagonizează efectul prolactinei.

Secreția de prolactină este controlată negativ de către hipotalamus. Factorul inhibitor este dopamina care, eliberată de terminațiile nervoase dopaminergice, ajunge la adenohipofiză prin sistemul circulator portal hipotalamo-hipofizar. Secționarea circulației portale determină creșterea secreției de prolactină. La alte specii prin mecanism feedback, prolactina inhibă propria sa sinteză.

### c. Hormonii hipofizari glicoproteici

Din acest grup fac parte gonadotropinele (Gn), FSH și LH, și tireotropina (TSH). O structură analoagă prezintă gonadotropina placentară (hCG = human chorionic gonadotropin). Acești hormoni au o origine ancestrală comună.

Hormonii glicoproteici au o structură dimerică  $\alpha\beta$ . Subunitatea  $\alpha$  constă dintr-un lanț polipeptidic cu 96 resturi aminoacidice și este identic la toți cei patru hormoni. Cuprinde două unități oligozaharidice legate covalent la resturi de asparagină. Subunitatea  $\beta$  diferă de la un hormon la altul, cuprinde 115 resturi aminoacidice la LH și FSH, 110 la tireotropină și 147 la hCG. Lanțul  $\beta$  din hCG cuprinde 5 unități oligozaharidice, subunitatea  $\beta$  din FSH, LH și TSH cite două. Subunitatea  $\beta$  este purtătoare de activitate biologică dar capacitatea de legare la receptorii celulari aparține dimerului  $\alpha\beta$ .

*Tireotropina* (TSH) este sintetizată în celulele tireotrope. TSH acționează asupra glandei tiroide stimulând sinteza de  $T_4$  și  $T_3$ . Intervine în toate fazele acestui proces, captarea și activarea iodului, iodurarea tireoglobulinei, cuplarea tirozinelor iodurate, hidroliza tireoglobulinei și secreția hormonilor. Acțiunea trofică a TSH asupra tiroidei este un efect tardiv și este datorat eliberării și acțiunii hormonilor tiroidieni însăși.

Reglarea eliberării TSH are loc printr-un mecanism feed-back tipic, la care participă hormonul hipotalamic eliberator (TRH) cu acțiune pozitivă asupra tiroidei și eliberarea în circulație de  $T_4$  și  $T_3$ . Hormonii tiroidieni inhibă atât sinteza și secreția de TRH cât și pe cea a TSH. Această ultimă acțiune pare a fi mediată de somatostatina.  $T_4$  și  $T_3$  stimulează sinteza de somatostatina care, la rândul ei, inhibă eliberarea de TSH.

TSH se formează și în alte regiuni ale creierului având rolul de neurotransmițător.

*Gonadotropinele*, LH (hormonul luteinizant) și FSH (hormonul stimulator al foliculilor) controlează funcțiile glandelor sexuale. Ele sînt secretate de celulele gonadotrope (5—9% din totalul celulelor adenohipofizei). Gonadotropina corionică (hCG) este produsă de placentă și prin acțiuni se aseamănă cu LH.

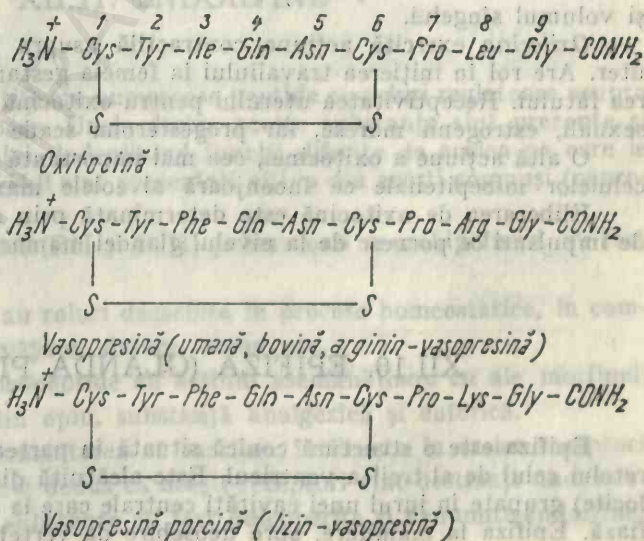


LH, la femei promovează sinteza de estrogeni și de progesteronă, inițiază ovulația. La bărbat, stimulează producția de testosteronă de către celulele interstițiale.

Secreția de gonadotropine hipofizare este reglată pozitiv printr-un hormon hipotalamic eliberator (GnRH) care stimulează secreția de LH și de FSH. Hormonii sexuali circulanți inhibă atât secreția de hormon hipotalamic eliberator cât și secreția tropinelor hipofizare.

Neurohipofiza elaborează și secretă doi hormoni, vasopresina sau hormonul antidiuretic (ADH) și oxitocina. Ambii hormoni sînt nonapeptide, diferind prin două resturi aminoacidice. Vasopresina umană (arg-vasopresină) este identică cu cea a altor specii. Vasopresina de la porc cuprinde în locul restului arg un rest lys (lys-vasopresina) (fig. XII.28).

Vasopresina (arg-vasopresina) are o masă de 1 084 daltoni și caracter bazic pronunțat ( $pI = 10,9$ ). Oxitocina (masa de 1 007 daltoni) este mai puțin bazică ca urmare a absenței restului arg sau lys.



**Fig. XII.28 —** Structurile vasopresinei și oxitocinei.

**Biosinteză.** Hormonii neurohipofizari sînt sintetizați în hipotalamus, vasopresina în nucleul supraoptic, oxitocina în nucleul paraventricular sub forma unor precursori cu moleculă mare. Prin prelucrarea acestor precursori rezultă, pe de o parte, vasopresina și neurofizina II, și pe de altă parte, oxitocina și neurofizina I. Hormonul împreună cu neurofizina specifică sînt transportați în lungul axonilor și depozitați în terminațiile nervoase din hipofiza posterioară. Exocitoza granulelor eliberează în circulația sanguină pe lângă nonapeptid și neurofizina corespunzătoare. Eliberarea oxitocinei și a vasopresinei este declanșată de stimuli diferiți.

Viața biologică a hormonilor neurohipofizari este scurtă ( $t_{1/2}$  de 2—4 minute), sînt rapid catabolizați în țesuturi periferice. O parte din vasopresină este eliminată ca atare prin urină.

Vasopresina participă la homeostazia osmolalității și a volumului fluidului extracelular, prin reglarea eliminării renale de apă. În prezența vasopresinei debitul urinar scade de la 15—20 ml/min la aproximativ 1 ml/min și osmolalitatea urinei crește de la 300 mosmoli/kg la 600—800 mosmoli/kg.

Vasopresina acționează asupra epiteliului tubilor contorți distali și colecitori crescînd fluxul transcelular de apă din lumen în fluidul extracelular. Hormonul mărește permeabilitatea pentru apă a membranei luminale a epiteliului tubular, probabil prin creșterea numărului de canale pentru apă.

Vasopresina acționează prin creșterea concentrației  $AMP_c$  și activarea proteinkinazei A dar nu este încă identificat efectorul ultim al acestor acțiuni.

Receptorii pentru vasopresină au fost identificați și în alte țesuturi și ocuparea acestora determină efecte mediate de  $AMP_c$ , ca glicogenoliză în ficat, eliberare de ACTH în adenohipofiză, constricția arteriolelor (acțiune vasopresoare). Nu este încă lămurit rolul fiziologic al acestor acțiuni.

Stimulii fiziologici pentru eliberarea vasopresinei sînt creșterea osmolalității plasmei (hemoconcentrare) și scăderea volumului fluidului extracelular, sesizate de osmoreceptori situați în hipotalamus și de baroreceptori din sistemul circulator. Vasopresina prin retenție de apă restabilește concentrația și volumul singelui.

**Oxitocina** exercită acțiune contractilă asupra musculaturii netede din uter. Are rol în inițierea travaliului la femeia gestantă la termen și expulzarea fătului. Receptivitatea uterului pentru oxitocină este reglată de hormoni sexuali, estrogenii măresc, iar progesterona scade receptivitatea.

O altă acțiune a oxitocinei, cea mai importantă fiziologic, este contracția celulelor mioepiteliale ce înconjoară alveolele mamare și ejecția laptelui.

Eliberarea de oxitocină este determinată prin mecanisme neuromorale de impulsuri ce pornesc de la nivelul glandei mamare sau al uterului.

## XII.10. EPIFIZA (GLANDA PINEALĂ)

Epifiza este o structură conică situată în partea supero-posterioară a perețului celui de al treilea ventricul. Este alcătuită din celule epiteliale (pinealocite) grupate în jurul unei cavități centrale care la adult, în genere, se calcifică. Epifiza la mamifere, spre deosebire de vertebralele inferioare, nu are

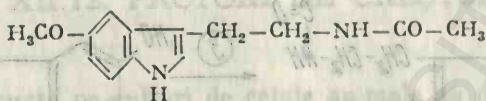


conexiuni directe cu creierul și cu ochii. Pineala primește impulsuri nervoase (via ganglionul cervical superior) privind iluminarea și întunericul independent de percepția conștientă de lumină.

La amfibieni, pineala are roluri antagonice cu ale melanotropinei (MSH), determină contracția celulelor melanofore și deschiderea culorii tegumentului. La mamifere se admite că are rol în reglarea bioritmurilor endocrine circadiene și sezoniere, în controlul funcțiilor sexuale (inhibă eliberarea de gonadotropine), a ritmurilor sezoniere de reproducere (la mamifere inferioare).

În epifiză au fost identificate numeroase substanțe bioactive: amine, norepinefrină, melatonină, serotonină, histamină, dopamină, peptide ca TRH, LH-RH, vasotocină (analog al vasopresinei și oxitocinei) și o proteină, epifizina.

Melatonina (O-metili-N-acetil-serotonină) este produsul specific al epifizei :



Sinteza sa are loc pornindu-se de la aminoacidul triptofon (fig. XII.29). Reacția limitantă de viteză este reacția (3), catalizată de serotonin-N-acetil transferaza. Secreția de melatonină este maximă noaptea și activitatea acetil transferazei urmează aceeași curbă. Conținutul pinealei în serotonin-N-acetil transferază crește, la trecerea de la iluminare la întuneric, de până la 100 ori. Totuși, în afară de lumină-întuneric eliberarea de melatonină este influențată și de alți factori: somn, postură, dietă, activitate. Nu s-a stabilit rolul celorlalte principii active din pineală.

## XII.11. ENDORFINE

În creier au fost identificate numeroase peptide cu roluri reglatoare asupra funcției nervoase superioare. Unele dintre aceste substanțe sînt prezente și în alte regiuni ale corpului, îndeplinind funcții diferite de acelea pe care le au în creier. În tabelul XII.9 sînt prezentați cîțiva din acești compuși (neuropeptide).

Hormonii hipotalamici (RH și RIH) și hormonii neurohipofizari au fost tratați anterior.

Peptidele din creier au roluri deosebite în procese homeostatice, în comportament, memorie, învățare, durere, somn etc.

Endorfinele sînt neuropeptide cu acțiuni asemănătoare cu ale morfinei, principiul activ extras din opiu, substanță analgezică și euforică.

Plecîndu-se de la constatarea că morfina înlînește în creier receptori cu care interacționează, s-a dedus că acești receptori sînt destinați unor substanțe endogene. Aceste substanțe au fost descoperite și denumite endorfine.





Inițial au fost identificate două substanțe morfine-like, pentapeptide, Met-encefalina și Leu-encefalina (Tabel XII.11). Ulterior s-au adăugat și altele,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -endorfină, dinorfină,  $\alpha$ -neo- și  $\beta$ -neo-endorfină.

Aceste peptide rezultă prin prelucrarea unor precursori polipeptidici. Proopiomelanocortina (POMC) dă naștere la  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -endorfină și Met-encefalina (din fragmentul  $\beta$ -LPH) (fig. XII.30). Un alt precursor, proencefalina A, dă naștere la patru molecule de Met-encefalina și una de Leu-encefalina. Proencefalina B (pronorfină) formează  $\alpha$ -neo-,  $\beta$ -neo-endorfină și dinorfină.

Prelucrarea acestor precursori se face diferențiat în diverse arii ale creierului și distribuția endorfinelor este diferită în diverși neuroni.

## XII.12. FACTORI DE CREȘTERE

Studiile efectuate pe culturi de celule animale au dus la constatarea că proliferarea celulelor *in vitro* nu are loc decît dacă mediul nutritiv cuprinde ingrediente naturale complexe ca ser, extract embrionic. Cercetările întreprinse pentru identificarea componentilor activi ai acestor ingrediente au dus la recunoașterea și identificarea unui număr de peptide necesare dezvoltării celulelor *in vitro*, denumite factori de creștere (GF — growth factor). Ulterior s-a găsit că acești factori sînt activi și asupra organismului întreg, ei acționează ca adevărați hormoni (sînt eliberați în sânge și sînt activi asupra unor țesuturi îndepărtate), ca substanțe paracrine (acționează asupra celulelor învecinate cu acelea secretorii) sau autocrine (sînt eliberate de o celulă și acționează asupra aceleiași celule) pentru a regla diferențierea embrionară, creșterea, dezvoltarea, vindecarea rănilor.

Au fost identificați numeroși factori de creștere, unii dintre ei au un spectru larg de acțiune:

- factori de creștere insulinlike (IGF — insulinlike growth factor, somatomedine);

- factorul de creștere derivat din trombocite (PDGF — platelet-derived growth factor);

- factorul de creștere al fibroblastilor (FGF — fibroblast growth factor);

- factorul de creștere al epidermei (EGF — epidermal growth factor).

A doua categorie de factori de creștere au acțiuni mai restrictive, reglează proliferarea și maturarea unor celule cu funcții specifice. Dintre acești factori mai importanți sînt:

- factorul de creștere al nervilor (NGF — nerve growth factor);

- eritropoietina (ESF — erythropoiesis stimulating factor);

- factori de creștere ai limfocitelor (limfokine);

- factori de creștere ai leucocitelor (granulocyte/macrophage colony stimulating factor).

*Factori de creștere insulinlike (IGF) sau somatomedine*

Existența acestor factori a fost postulată încă din anul 1957 ca substanțe secundare induse de hormonul de creștere (GH) și care mediază acțiunile stimulative ale acestuia asupra creșterii. Au fost denumite inițial factori de

sulfatare, fiind implicați în sinteza de proteoglicani (condroitin sulfati) în țesutul conjunctiv. O altă denumire de somatomedine sugerează rolul mediator pe care îl au acești factori în acțiunile somatotropinei.

Există doi IGF: IGF-I (somatomedina propriu-zisă) și IGF-II. Ambii sînt polipeptide, IGF-I cuprinde 70 resturi aminoacidice, are caracter bazic ( $pI = 8,1-8,5$ ). IGF-II cuprinde 67 resturi aminoacidice și este neutru. IGF-I și II se aseamănă structural între ele și ambele se aseamănă cu insulina.

IGF sînt sintetizate în diverse țesuturi, în principal în ficat. În plasmă circulă sub formă de complexe cu o proteină transportoare specifică, a cărei sinteză hepatică este indusă de GH. Existența acestor complexe explică durata medie de viață a IGF mai ridicată decît a altor hormoni polipeptidici. Se crede că acțiunea stimulatorie asupra creșterii se manifestă și paracrin.

IGF interacționează la nivel celular cu receptori distincți. Receptorul de tip I leagă cu afinitate mare IGF-I, dar poate lega slab pe IGF-II și insulină. Receptorul de tip II are afinitate mare pentru IGF-II dar poate lega cu afinitate moderată și IGF-I.

Receptorul de tip I prezintă o înaltă omologie structurală cu receptorul insulinic. Este un heterodimer  $\alpha_2\beta_2$  cu dimensiuni și însușiri similare cu receptorul insulinic. Subunitatea  $\alpha$  cuprinde situsul de legare a hormonului, subunitatea  $\beta$  are activitate protein-kinazică (tirozina specifică). Receptorul de tip II este alcătuit dintr-un singur lanț polipeptidic cu masa de 260 000 daltoni.

Datorită asemănărilor structurale dintre hormoni și receptori există o reactivitate încrucișată între insulină și receptorul IGF de tip I, pe de o parte, și între IGF-I și receptorul insulinic, pe de altă parte. Se admite că efectele de hormon de creștere ale insulinei sau efectele metabolice ale IGF-I sînt datorate reacțiilor încrucișate între insulină și receptor IGF și, respectiv, între IGF și receptorul insulinic.

IGF exercită acțiuni stimulatorie asupra multor tipuri de celule și de la diverse specii, ca fibroblaști, condrocite, celule gonadice (celule Sertoli). Intervin în proliferarea și diferențierea celulară, în sinteza unor componente specifice cum sînt proteoglicanii și alți componente ai matricei conjunctive.

De asemenea, IGF sînt activi asupra organismelor întregi, stimulînd creșterea. Se admite că GH controlează sinteza și eliberarea de IGF. Aceștia din urmă prin mecanism feedback inhibă eliberarea de GH (paralel prin stimularea eliberării de somatostatina). Nivelul plasmatic al IGF este modificat față de normal la indivizi cu acromegalie (crescut) sau cu hipopituitarism (scăzut).

*Factorul de creștere a epidermei (FGF — epidermal growth factor).*

A fost izolat inițial dintr-un extract de glandă salivară de la șoarece și identificat prin acțiunea sa proliferativă asupra epidermei. Ulterior s-a găsit că EGF este eliberat de celule de origine diversă și de la specii diferite. EGF uman a fost identificat cu un peptid izolat anterior din urina femeilor gravide — urogastrona — cu acțiune protectoare asupra mucoasei gastrice.

EGF este un polipeptid cu 53 resturi aminoacidice. Cuprinde trei legături disulfurice intralanț. Este rezultat prin prelucrarea unui precursor pro-EGF.



EGF acționează ca factor de creștere, în principal, pentru celule de origine ectodermală. Se consideră că în viața fetală promovează proliferarea și diferențierea țesuturilor epiteliale.

În sprijinul acestei idei stă și faptul că EGF este prezent în lichidul amniotic, în laptele colostrăl. Concentrația mare a EGF în colostru este în legătură cu adaptarea tractului gastrointestinal la viața postnatală.

Receptorul pentru EGF a fost identificat în diverse țesuturi și a constituit obiectul unor studii ample. După legarea hormonului dobândește activitate protein kinazică (tirozin specifică), se autofosforilează și fosforilează alte proteine. Activitatea protein kinazică a receptorilor stimulați de hormoni este o însușire comună și a altor factori de creștere (IGF, insulină), a peptidelor specificate de oncogene virale.

*Factorul de creștere eliberat de plachele* (PDGF — platelet-derived growth factor).

Acest factor de creștere a fost descoperit pe baza studiilor inițiate pentru a explica de ce serul este mai eficient decât plasma în susținerea proliferării celulelor în culturi în vitro. S-a conchis că în cursul coagulării singelui trombocitele eliberează un factor mitogen. Acest factor a fost denumit PDGF. S-a mai stabilit că trombocitele activate joacă un rol important nu numai în inițierea coagulării singelui, ci prin eliberare de PDGF intervin în vindecarea rănilor inducând proliferarea celulelor la nivelul țesutului lezat.

PDGF este un peptid bazic ( $pI = 9,8-10,2$ ), alcătuit din două lanțuri cu masa de aproximativ 12 000 daltoni și respectiv, 18 000 daltoni. PDGF prezintă o înaltă omologie structurală cu proteina v-sis proteină codificată de oncogena virusului simian producător de sarcom (sis — simian sarcoma virus).

PDGF acționează ca factor de creștere pentru fibroblaști, având un rol deosebit în vindecarea rănilor. PDGF i se atribuie un rol deosebit în patogenizarea aterosclerozei, fiind responsabil de proliferarea peretelui arterial ca răspuns la formarea plăcii ateromatoase și lezarea suprafeței intimei vaselor.

PDGF intervine în evenimente inițiale ale diviziunilor celulare. PDGF constituie semnalul pentru ca o celulă să treacă punctul de restricție, să traverseze faza  $G_1$  a ciclului celular și să intre în faza S. Celulele stimulate de către PDGF devin competente pentru proliferare.

*Factorul de creștere a fibroblaștilor* (FGF — fibroblast growth factor).

Polipeptid cu masă de aproximativ 13 400. A fost identificat în extractul de creier. Are acțiune stimulatorie asupra proliferării multor linii celulare de origine endodermală și mezodermală. Intervine în etape inițiale ale diviziunii celulare într-un mod similar cu PDGF (factor de competență).

*Factori de creștere cu specificitate înaltă de țesut.* Factorii de creștere descriși mai înainte IGF, EGF, PDGF, FGF, sînt activi asupra unei varietăți mari de tipuri celulare. Au fost descrise însă numeroase peptide care acționează ca factori de diferențiere a unor celule primordiale rezultînd celule înalt specializate, celule nervoase, celule care sintetizează anticorpi, macrofage etc.

*Eritropoietina* (ESF — erythropoiesis stimulating factor). Glicoproteina cu masa de 39 000 daltoni. Are rol în proliferarea și diferențierea celulelor primitive din măduvă în proeritrocite și a acestora în celule care sintetizează hemoglobina.

Eritropoietina se formează dintr-o proteină plasmatică de origine hepatică, asupra căreia acționează un factor renal, eritrogenina (cu acțiune proteazică).

Sinteza de eritropoietină este controlată de gradul de oxigenare tisulară, hipoxia determină diminuarea sintezei, iar hipoxia stimulează sinteza de eritropoietină.

*Factorul de creștere a nervilor* (NGF — nerve growth factor). Substanța activă izolată de la șoarece este o proteină hexamerică  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$  cu masă de 130 000 daltoni. Activitatea biologică aparține subunității  $\beta$  (118 aminoacizi).

NGF este produs de diverse țesuturi. Acționează în viața embrionară ca factor de diferențiere a sistemului nervos. La adult ar avea rolul de întreținere a sistemului nervos simpatic.

Sinteza de NGF este stimulată de androgeni și de hormoni tiroidieni. Se admite că efectele hormonilor tiroidinei asupra creierului sînt mediate prin inducția sintezei de NGF în creier.

*Factori de creștere a limfocitelor* (limfokine). Au fost descrise numeroase peptide care reglează creșterea și maturarea sistemului limfoid. Din această familie fac parte interleukinele 1, 2 și 3. Interleukina 1, polipeptid cu masa între 12 000 și 18 000 daltoni, este denumit și factor activator al celulelor B; interleukina 2, masa aproximativ 15 000 daltoni, este denumit și factor de creștere a celulelor T. Interleukina 3 (28 000 daltoni) are acțiune similară cu a interleukinei 2, dar acționează asupra maturării limfocitelor într-o fază mai timpurie.

Din timus au fost obținute peptide cu acțiune stimulatorie asupra proliferării și maturării limfocitelor primitive în celule T imunologic competente (timopoiatina, timozina).

#### *Factori de creștere codificați de oncogene.*

Din tumori produse de virusuri la diverse specii au fost izolate peptide ce au fost implicate în proliferarea malignă a celulelor. Genele care specifică aceste peptide au fost denumite oncogene. Din diverși virusuri izolați din tumori s-au identificat aproximativ 30 oncogene. Aceste gene sînt desemnate prin litera „v” (de la virus) urmată de o prescurtare de trei litere care să indice sursa originală a virusului. De exemplu: v-src este oncogenul virusului din sarcom Rous; v-erb B, gena virusului producător de eritroblastoză la păsări; v-sis, gena virusului producător de sarcom la maimuță (simian sarcoma virus).

Aceste gene codifică proteine, factori care determină creșterea tumorală. Din analiza proteinelor codificate de unele oncogene virale a rezultat că aceste proteine prezintă multe asemănări cu factorii de creștere ai dezvoltării normale a țesuturilor. Astfel, s-a stabilit că proteina codificată de oncogenul v-sis este înrudită cu PDGF, cea codificată de oncogenul v-erb este similară cu receptorul EGF. De asemenea, multe oncogene codifică proteine cu activitate tirozin-kinazică sau care stimulează această activitate enzimatică, ceea ce arată că fosforilarea unor proteine la resturi tirozil constituie un semnal mitogen, un stimul pentru proliferare celulară.



Virusurile care cuprind oncogene sînt retrovirusuri și au capacitatea de încorporare a ADN din celulele gazdă. Oncogenele au fost dobîndite de virus de la celulele normale pe care le-au infectat, sînt versiuni alterate ale unor gene celulare normale. Proteinele specificate de acestea din urmă sînt implicate într-un mod sau altul în controlul diviziunii celulare, sînt factori de creștere, receptori pentru factori de creștere sau au altă funcție legată de proliferarea celulară.

Tabel XII.9

Structurile unor neuropeptide

Somatostatină 14	Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys.
Somatostatină 28	Ser-Ala-Asn-Ser-Asn-Pro-Ala-Met-Ala-Pro-Arg-Glu-Arg-Lys-Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys
VIP (vasoactive intestinal peptide)	His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Glu-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-NH <sub>2</sub>
NPY (neuropeptidul Y)	Tyr-Pro-Ser-Lys-Pro-Asp-Asn-Pro-Gly-Glu-Asp-Ala-Pro-Ala-Glu-Asp-Leu-Ala-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ala-Leu-Arg-His-Tyr-Ile-Asn-Leu-Ile-Tyr-Arg-Glu-Arg-Tyr-NH <sub>2</sub>
Substanța P	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>
Colecistokinină (CCK)	Asp-Tyr(SO <sub>3</sub> )-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub>
DSIP (delta sleep inducing peptide)	Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu.
Met-Enkefalină	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met.
Leu-Enkefalină	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu
X-Endorfină	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Glu-Thr-Pro-Leu-Val-Thr.

XIII.1. APA ȘI PROCESELE HIDROELECTROLITICE DIN ORGANISM

Apa este principalul constituent al tuturor ființelor vii. Deși ea este foarte abundentă în proporții apreciabile în aceste organisme (peste 70% din greutatea corporală la om), ea este totuși cea mai puțin cunoscută din punct de vedere al mecanismelor care reglează concentrația ei în organism. De exemplu, organismele unor animale marine, în special peștele, sunt capabile să absoarbă apă din mediu în care trăiesc (98,45%) în care trăiesc (98,45%).

Conținutul în apă al vertebratelor este mai redus din cauza scheletului care ocupă o mare parte din corp și este sărat în apă. În ceea ce privește organismul omului, conținutul în apă se află în raport direct cu suprafața corpului. Pe de altă parte, în funcție de activitatea, corpul omului conține între 50% și 60% apă.

## Cap. XIII. METABOLISMUL MINERAL

În organism, alături de ceilalți constituenți și compuși funcționali organici, elementele minerale împlinesc roluri structurale și metabolice de interes primordial.

Fiecare element mineral din organism suferă unele modificări din punct de vedere al combinațiilor în funcție de metabolismul altor substanțe. De asemenea, prin prezența lor, elementele minerale condiționează adesea transformările celor mai importanți compuși funcționali organici.

Cercetarea metabolismului mineral se va face în acest capitol prin trecerea în revistă a celor mai importante elemente minerale din organism arătându-se, pentru fiecare, proporția în care se află, procesele metabolice la care participă precum și consecințele deficienței sau surplusului. Însă, ținând seama de faptul că apa este cea mai abundentă și importantă substanță minerală din corp, prezentarea ei va fi făcută la începutul acestui capitol. Totodată, se vor menționa și procesele hidroelectrolitice de interes biochimic sau medical desfășurate în mediul intern.

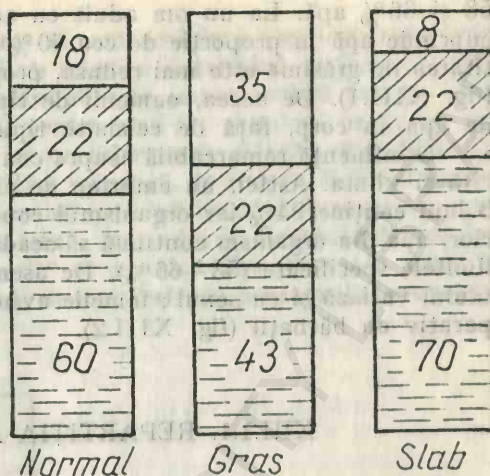
### XIII.1. APA ȘI PROCESELE HIDROELECTROLITICE DIN ORGANISM

Apa este principalul constituent al tuturor ființelor vii. Deși se află totdeauna în proporții apreciabile în aceste organisme (peste 60%), gradul de hidratare al lor variază cu natura speciei. De exemplu, organismele unor animale marine, inferioare, sînt aproape tot atît de bogate în apă ca și mediul în care trăiesc (96,45%).

Conținutul în apă al vertebratelor este mai redus din cauza scheletului care ocupă o mare parte din corp și este sărac în apă. În ceea ce privește organismul omului, conținutul în apă se află în raport direct cu suprafața corporală. Pe de altă parte, în funcție de adipozitate, corpul omului conține între



Fig. XIII.1 — Conținutul procentual în apă a diferitelor tipuri constituționale.



- Masă corporală grasă
- Masă corporală lipsită de grăsime
- Apă

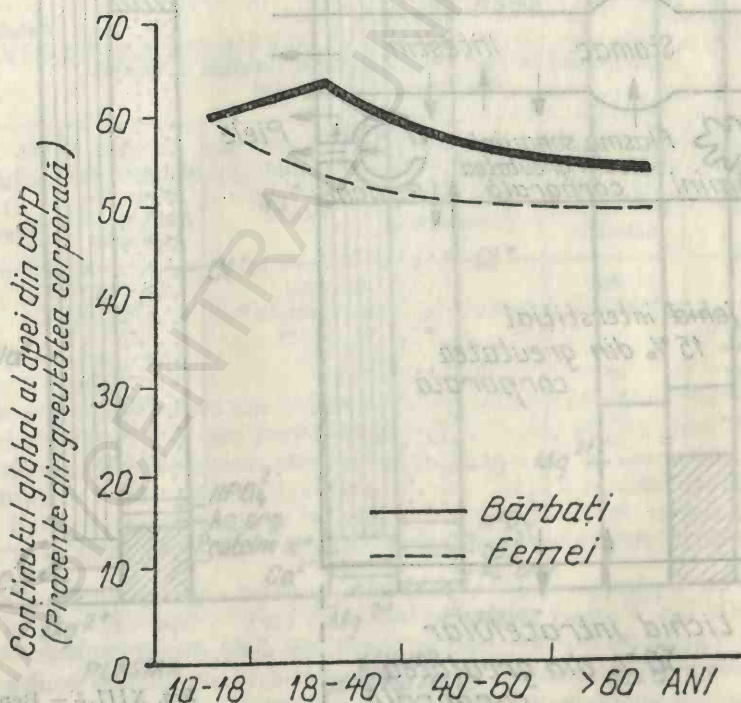


Fig. XIII.2 — Conținutul în apă al corpului în funcție de sex și vîrstă.

58 și 66 % apă. La un om adult cu adipozitate normală (22%) organismul cuprinde apă în proporție de cca 60% din greutate. Bineînțeles, cu cât cantitatea de grăsime este mai redusă, proporția de apă este mai mare și invers (fig. XIII.1). De aceea, oamenii de tip athletic cuprind proporții mai mari de apă în corp, față de celelalte tipuri constituționale.

O influență remarcabilă asupra conținutului în apă al organismului exercită și vârsta. Astfel, un embrion de câteva zile conține 97% apă; fătul de 3 luni conține 94% iar organismul copilului la naștere cuprinde 66%. Ulterior, apa din organism continuă să scadă încet cu vârsta, menținându-se între limitele specificate (58—66%). De asemenea, conținutul în apă al organismului variază și cu sexul; femeile având un conținut mai redus de apă, comparativ cu bărbații (fig. XIII.2).

### XIII.1.1. REPARTIȚIA APEI ÎN ORGANISM

Apa din organism este repartizată în vasele sangvine și limfatice, spațiile intercelulare și celulele însăși. Aceste domenii se deosebesc prin localizarea lor, prin compoziție și roluri funcționale. Datorită diferențierilor existente, ele sînt grupate în două sectoare hidrice: *sectorul intracelular* care reprezintă aproape 50% din greutatea corpului și *sectorul extracelular* care reprezintă 20% din greutatea corpului (fig. XIII.3).

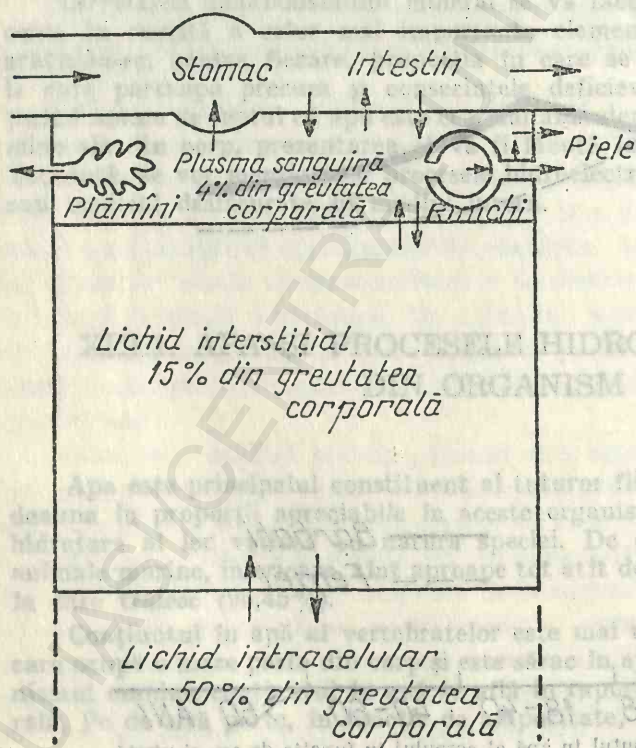


Fig. XIII.3 — Repartiția apei în organism (după Gamble).



Cele două sectoare hidrice (intra- și extracelular) sînt separate prin membrana celulară a cărei permeabilitate selectivă determină deplasările apei și electroliților. De fapt, această membrană este impermeabilă pentru ioni  $\text{Na}^+$  și anionii mari și este permeabilă pentru ioni  $\text{K}^+$  și anionii mici. Ca urmare, compoziția lichidelor extra- și intracelulare este diferită (fig. XIII.4).

Din schema prezentată în fig. XIII.4 reiese că, în esență, lichidul extracelular este „o soluție de clorură de sodiu” pe cînd lichidul intracelular este „o soluție de fosfați și proteinat de potasiu”. Într-adevăr, lichidul intracelular cuprinde o cantitate foarte mică de  $\text{Cl}^-$  și practic deloc  $\text{Na}^+$ ; în schimb, conține o cantitate foarte mare de  $\text{K}^+$  și de ioni fosforici precum și o proporție mare de proteine.

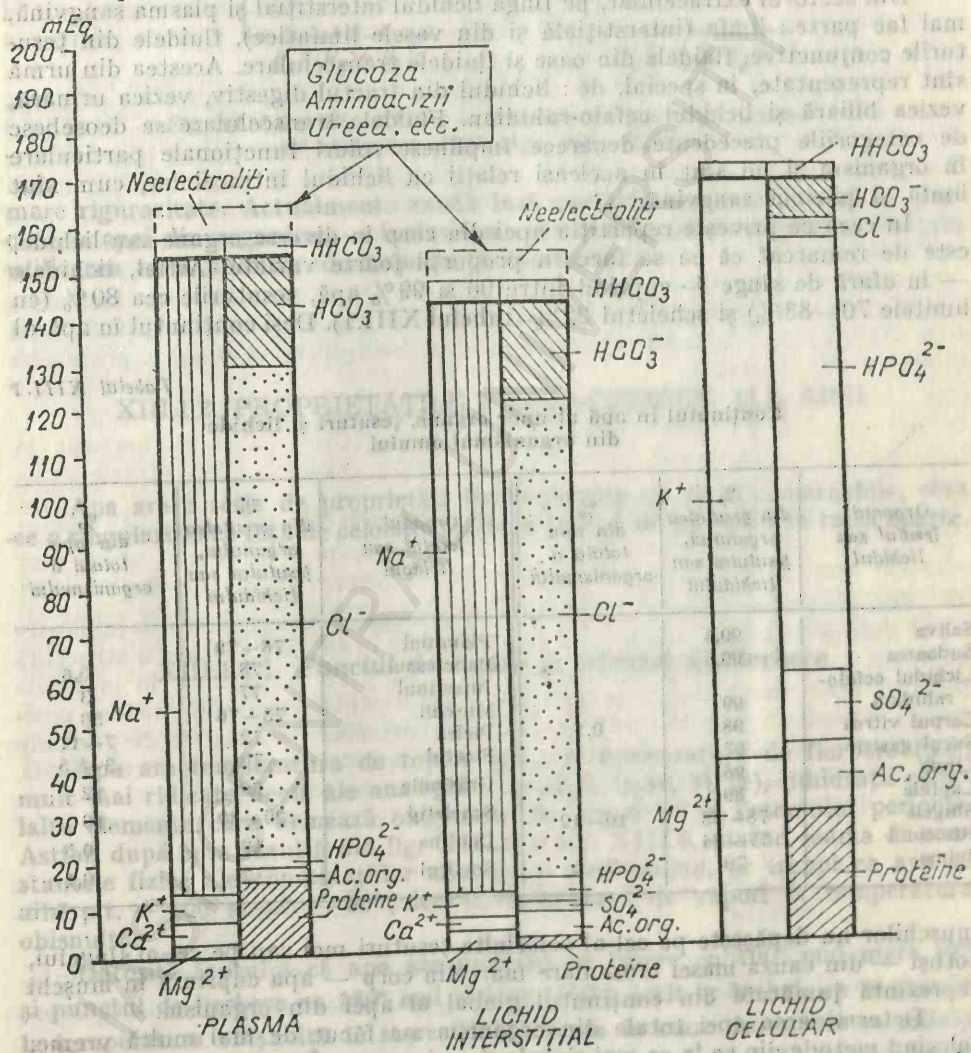


Fig. XIII.4 — Compoziția electrolițică a lichidelor intra- și extracelulare, exprimată în mEq/L (după Gamble).

Sectorul extracelular este constituit — la rîndul său — din două compartimente: *lichidul interstițial* care ocupă spațiile intercelulare, reprezentînd 16% din greutatea corpului și *plasma sanguină* care reprezintă 4% din greutatea corpului. Aceste două compartimente sînt separate prin pereții vaselor capilare, permeabili pentru electroliți și molecule organice mici dar nu întotdeauna permeabili pentru proteine. Datorită permeabilității selective a pereților vaselor sanguine apar diferențe în compoziția compartimentelor extracelulare. Astfel, plasma cuprinde concentrații mari de ioni  $\text{Na}^+$  și  $\text{Cl}^-$ , concentrații reduse de ioni  $\text{K}^+$  și fosforici precum și concentrații apreciabile de proteine. Lichidul interstițial cuprinde mult mai puține proteine însă compoziția sa în anioni și cationi este asemănătoare cu cea a plasmiei.

Din sectorul extracelular, pe lângă lichidul interstițial și plasma sanguină, mai fac parte: limfa (interstițială și din vasele limfatice), fluidele din țesuturile conjunctive, fluidele din oase și fluidele transcelulare. Acestea din urmă sînt reprezentate, în special, de: lichidul din tractul digestiv, vezica urinară, vezica biliară și lichidul cefalo-rahidian. Fluidele transcelulare se deosebesc de categoriile precedente deoarece împlinesc roluri funcționale particulare în organism și nu sînt în aceleași relații cu lichidul intracelular, cum sînt limfa și plasma sanguină.

În ceea ce privește repartitia apei din corp în diverse organe sau lichide, este de remarcă că ea se face în proporții foarte variate. Astfel, lichidele — în afară de sînge — cuprind între 96 și 99% apă, țesuturile cca 80% (cu limitele 70—83%) și scheletul 22% (tabelul XIII.1). Deși conținutul în apă al

Tabelul XIII.1

Conținutul în apă al unor organe, țesuturi și lichide  
din organismul omului

Organul, țesutul sau lichidul	% din greutatea organului, țesutului sau lichidului	% din apa totală a organismului	Organul, țesutul sau lichidul	% din greutatea organului, țesutului sau lichidului	% din apa totală a organismului
Saliva	99,5		Plămînul	78—79	
Sudoarea	99,5		Pancreasul	78	0,6
Lichidul cefalo- rahidian	99		Intestinul	77	3
Corpul vitros	98	0,1	Mușchii	73—76	50
Sucul gastric	97		Pielea	72	7—11
Limfa	96		Ficatul	70	3—5
Lapte	89		Grăsimile	30	12
Sîngele	78—83	10—12	Scheletul	20—30	10
Rinichiul	77—84		Dentina	10	0,5
Înțima	79	2—5	Smălțul	2	0,1

mușchilor nu depășește pe cel al celorlalte țesuturi moi sau pe cel al sîngelui, totuși — din cauza masei musculare mari din corp — apa cuprinsă în mușchi reprezintă jumătate din conținutul global al apei din organism.

Determinarea apei totale din organism s-a făcut de mai multă vreme, folosind metode din ce în ce mai simple și mai precise. În schimb, apa cuprinsă în țesuturi nu s-a putut determina totdeauna (țesut slab, țesut gras) cu foarte



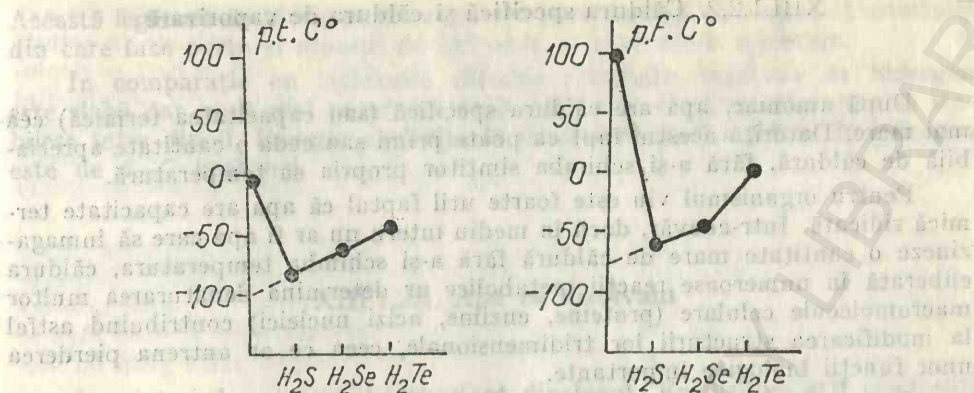


Fig. XIII.5 și Fig. XIII.6 — Punctele de topire și fierbere ale analogilor: H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>S, H<sub>2</sub>Se, H<sub>2</sub>Te.

mare rigurozitate. Actualmente există însă posibilitatea determinării cu precizie a apei din organism — inclusiv a celei din țesuturi și grăsimi — prin utilizarea unui analizor de impedanță bioelectrică.

### XIII.1.2. PROPRIETĂȚILE FIZICO-CHIMICE ALE APEI

Apa are o serie de proprietăți fizico-chimice cu totul remarcabile, ceea ce o singularizează față de celelalte fluide, o face să fie un lichid cu totul aparte.

#### XIII.1.2.1. Punctul de topire și punctul de fierbere

Apa are temperatura de topire (p.t.) și temperatura de fierbere (p.f.) mult mai ridicate decât ale analogilor ei (H<sub>2</sub>S, H<sub>2</sub>Se, H<sub>2</sub>Te), dihidrații celorlalte elemente care urmează oxigenului în grupa VI a sistemului periodic. Astfel, după cum rezultă din fig. XIII.5 și fig. XIII.6, ținând seama de constantele fizice ale combinațiilor analoge și extrapolând, ar trebui ca apa să aibă p.t. — 100° și p.f. — 80°; deci să fie în stare de vapori la temperatura obișnuită.

Datorită faptului că apa are punctul de topire cu 100° mai mare (0°) și punctul de fierbere cu 180° mai ridicat (100°) decât ar trebui, ea se găsește la temperatura obișnuită în stare lichidă și nu în stare de vapori ca ceilalți dihidrați analogi. Însușirea de a fi lichidă îi conferă rolul de mediu intern prin excelență.

### XIII.1.2.2. Căldura specifică și căldura de vaporizare

După amoniac, apa are căldura specifică (sau capacitatea termică) cea mai mare. Datorită acestui fapt ea poate primi sau ceda o cantitate apreciazabilă de căldură, fără a-și schimba simțitor propria sa temperatură.

Pentru organismul viu este foarte util faptul că apa are capacitate termică ridicată. Într-adevăr, dacă în mediu intern nu ar fi apa care să înmagazineze o cantitate mare de căldură fără a-și schimba temperatura, căldura eliberată în numeroase reacții metabolice ar determina denaturarea multor macromolecule celulare (proteine, enzime, acizi nucleici) contribuind astfel la modificarea structurii lor tridimensionale, ceea ce ar antrena pierderea unor funcții biologice importante.

Apa are și o mare căldură de vaporizare. Evaporarea unui litru de apă prin piele și prin mucoasa căilor respiratorii face ca să se piardă 580 kcal din căldura corpului. Pe de altă parte, organismul omului adult pierde zilnic (fără a se ține seama de pierderile prin transpirație) cca 1 200 ml apă, eliberând astfel 686 Kcal (*perspiratio insensibilis*). Pierderile prin transpirație, sînt și ele foarte importante; în caz de efort, secreția sudorală poate crește pînă la 1 600 ml/oră. Dacă această cantitate de apă se evaporă total, corpul mai pierde încă 900 Kcal/oră. Prin urmare, supraîncălzirea corpului este preîntîmpinată de căldura mare de vaporizare a apei. Acest fapt contribuie, fără îndoială, la asigurarea desfășurării normale a proceselor biologice din organism.

### XIII.1.2.3. Polaritatea moleculei de apă

Din cauza caracterului mult mai electronegativ al oxigenului comparativ cu al hidrogenului, molecula apei este un dipol. Totodată, ea are o structură angulară (unghiul dintre valențe egal cu  $104,5^\circ$ ). În consecință, în molecula polară a apei există centre de greutate diferite pentru sarcinile electrice pozitive și negative. Ținînd seama de valoarea sarcinilor în centrele de greutate respective și de distanța dintre ele, apa are un dipolmoment egal cu 1,84 D. ( $D = \text{debye} = 10^{-18} \text{ u.e.s.x cm}$ ).

#### Asocierea moleculară și legătura de hidrogen

Datorită faptului că sînt dipoli, moleculele de apă se asociază grupîndu-se cîte 3, 4, 6 sau mai multe molecule, în funcție de starea de agregare a apei.

Asocierea dintre moleculele apei nu este datorită numai unei simple atracții electrostatice între dipoli ci și unei adevărate legături, *legătura de hidrogen*.



Această legătură de hidrogen se stabilește între atomul de oxigen al moleculei din care face parte și atomul de hidrogen al unei a 2-a molecule.

În comparație cu legăturile chimice obișnuite, legătura de hidrogen este slabă dar mult mai puternică decât legăturile electrostatice care se stabilesc între dipoli. Energia cheltuită la desfacerea unei legături de hidrogen este de 4—7 kcal/mol.

#### XIII.1.2.4. Apa ca dizolvant

Apa este cel mai bun și important dizolvant. Ea dizolvă atât electroliți (acizi, baze, săruri) cit și compuși neionizați (anorganici sau organici).

La dizolvarea diverselor substanțe ionizate în apă, moleculele acestea se orientează în jurul ionilor ca în fig. XIII.7.

Ionii se înconjură astfel cu o „pătură“ de apă, stabilindu-se legături slabe de atracție între ionii și dipolii apei. Ionii cu rază mai mică leagă mai multe molecule de apă și mai puternic decât cei cu raza mai mare. Spre exemplu, ionul  $\text{Na}^+$  nehidratat are raza 0,098 nm și se hidratează cu 8 molecule de apă, ajungînd — după hidratare — la raza 0,24 nm, pe cînd ionul  $\text{K}^+$  nehidratat, cu raza 0,133 nm, se hidratează numai cu 4 molecule de apă, ajungînd după hidratare la raza de 0,17 nm.

Pătura hidratantă care înconjură ionii îi împiedică să se apropie între ei, ușurîndu-le independența în diverse deplasări; spre exemplu, în traversarea membranelor celulare. Aceste traversări sînt diferențiate pentru diverșii ioni, în funcție de mărimea ionilor hidratați; ele sînt mai rapide în cazul ionilor hidratați cu rază mai mică și mai lente pentru ionii hidratați cu rază mai mare. Datorită acestui fapt, pătrunderea ionilor hidratați de potasiu prin majoritatea membranelor biologice este mult mai ușoară decât a ionilor de sodiu hidratați. Prezența păturii hidratante la suprafața ionilor creează însă și unele neajunsuri; în special, cînd doi ioni încărcăți electric diferit trebuie să se combine.

Multe molecule neionizate — în special, moleculele complexe de tipul proteinelor, acizilor nucleici, polizaharidelor — se pot înconjura și ele cu molecule de apă. Între macromoleculele respective și apă se stabilesc legături de hidrogen, deci și macromoleculele, datorită structurii lor chimice (cuprinzînd grupări sau atomi susceptibili de a forma legături de hidrogen cu apa)

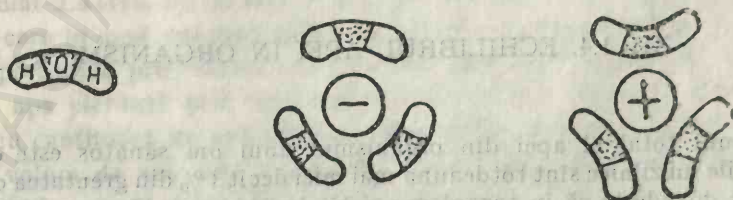


Fig. XIII.7 — Ioni hidratați.

se pot hidrata. În soluții apoase diluate macromoleculele rețin o parte din apă la suprafață, constituindu-se astfel *apa legată*. Așadar, se distinge în soluție *apa legată* și *apa liberă*. Aceasta din urmă constituie mediul în care se deplasează apa legată odată cu molecula pe care o hidratează. Prin intermediul apei legate se pot stabili diverse schimbări între molecule și apa liberă. Aceste fenomene de schimb au loc în permanență; de exemplu, între ionii constitutivi ai osului și cei corespunzători din plasmă, în special, ionii de calciu și fosfat.

O comportare particulară față de apă o au substanțele amfipatice caracterizate prin afinitate dublă; pentru apă și pentru solvenți apolari. Substanțele amfipatice se orientează cu grupările polare (hidrofile) spre apă, interacționând cu ea și cu cele hidrofobe se îndreaptă spre solvenții apolari. Așa se explică dispunerea substanțelor amfipatice (spre exemplu, acizii grași cu molecule mari) sub formă de filme la suprafața apei.

### XIII.1.3. ROLURILE APEI ÎN ORGANISM

Apa îndeplinește în organisme roluri multiple și variate, datorate — în mare măsură — proprietăților ei specifice. În primul rând, apa are rol structural intrînd în constituția țesuturilor; o parte este distribuită în spațiile libere dintre moleculele mari (în genere, proteice) iar o parte este reținută la suprafața macromoleculelor, ca apă legată.

În al doilea rînd, apa este „mediul interior” în care se distribuie toate substanțele solubile, organice și anorganice. Datorită acestei însușiri de solvent, apa transportă în organism atât substanțele nutritive cît și produsele de excreție rezultate în urma diverselor metabolisme.

Apa este un metabolit universal împlinind pe de o parte, rol de reactant iar pe de altă parte, rol de produs de reacție în numeroase și diverse reacții biochimice fundamentale: digestia, dislocarea majorității constituenților organismului, reacții de oxidoreducere, reacții în urma cărora se eliberează energie (hidroliza ATP-ului și a altor compuși macroergici).

Alături de rolurile menționate, apa îndeplinește și rolul fundamental de aliment indispensabil care asigură în organism desfășurarea normală a metabolismului tuturor celorlalte principii nutritive (cap. XXI).

### XIII.1.4. ECHILIBRUL APEI ÎN ORGANISM

Volumul total al apei din organismul unui om sănătos este constant iar variațiile lui zilnice sînt totdeauna mai mici decît 1% din greutatea corpului. Acest fapt dovedește că în organism există, în permanență, un echilibru între apa ingerată și cea excretată (tabelul XIII.2).



## Echilibrul zilnic al apei

Apa ingerată (ml)		Apa excretată (ml)	
Din lichidele ingerate aprox.	1 500	Eliminare prin urină	1 500
Din constituția alimentelor solide	800	Eliminare prin piele (perspirație insensibilă)	600
Prin oxidarea principiilor imediate dintr-o rație care procură 2 500 cal:		Vaporizare la nivelul plămînilor	400
100 g proteine	41	Eliminare prin fecale	100
110 g lipide	118	Total	2 600 ml
244 g glucide	135		
	294		
Total aprox.:	2 600 ml		

Păstrarea acestui echilibru este cu atât mai remarcabilă, cu cît se știe că ingerările și excrețiile zilnice variază de la individ la individ iar pentru aceeași persoană, de la o zi la alta. De fapt, constanța echilibrului se datorează bunei funcționări a sistemului reglator din hipotalamus precum și activităților renală și hormonală (în special, a hormonului antidiuretic secretat de hipofiza posterioară). Bineînțeles, reglarea normală este posibilă numai între anumite limite de variație ale apei din organism. Cînd acestea sînt depășite, echilibrul se strică și apar fie pierderi masive, fie acumulări excesive.

## XIII.1.4.1. Pierderile de apă

Așa cum rezultă din tabelul XIII.2, pierderile de apă au loc în mod obișnuit prin plămîni, piele, urină și tract gastro-intestinal. La rîndul lor, aceste pierderi variază — în mod semnificativ — cu condițiile de climă, natura rației alimentare și starea de sănătate. Într-adevăr, pierderile de apă prin transpirație și plămîni sînt mult crescute în condiții de climă uscată, temperaturi ridicate ale mediului ambiant, activitate intensă sau febră (determinată din diverse motive). În asemenea cazuri, pierderile de apă prin transpirație pot depăși chiar 2,5 l oră. Pe de altă parte, apa secretată prin tractul gastro-intestinal — care în mod obișnuit este reabsorbită — se poate pierde și ea în cantitate apreciabilă prin diaree sau datorită altor boli intestinale. În ceea ce privește apa pierdută prin urină, se consideră că ea variază, direct proporțional, cu cantitatea de apă ingerată. Însă, independent de aportul hîdric, un anumit volum de apă este necesar totdeauna pentru excreția substanțelor osmotice-actieve; în special, ureea și clorura de sodiu. La rîndul lor, cantitățile excretate din aceste substanțe depind de aportul proteic și al sării din rație.

În aceste condiții, calculele au arătat că fiecare gram de proteină dietară corespunde la 5 mosm. și fiecare gram de sare generează 34 mosm. ( $1 \text{ mosm} = 1 \text{ mmol}$  substanță solubilizată  $\times n$ ; în care  $n = \text{nr. particulelor produse prin disociere}$ ). O rație obișnuită care conține 100 g proteine și 10 g sare generează:  $(100 \times 5) + (10 \times 34) = 840 \text{ mosm}$ . Ținând seama de faptul că rinichiul poate concentra urina la aproximativ 1 400 mosm/L, rezultă că numai pentru excreția acestor substanțe solubile este necesar un volum de  $840 : 1400 = 600 \text{ ml apă}$ .

#### XIII.1.4.2. Necesarul zilnic de apă

Din menționarea multiplelor cauze ale pierderilor de apă reiese necesitatea unor aporturi adecvate, fără de care nu ar fi posibilă menținerea echilibrului hidric în organism. Datele tabelului XIII.2 arată că majoritatea apei ingerate provine din lichide și apoi din cea aflată în alimentele solide. O cantitate mult mai mică, dar care se formează zilnic, este cea rezultată din oxidarea — în urma metabolizării — principiilor imediate. Într-adevăr, 1 g glucid (amidon) generează 0,6 g apă, 1 g proteină 0,41 g și 1 g lipid generează 1,07 g apă metabolică.

Din cauza factorilor de variabilitate (condiții de climă, natura activității depuse) nu s-a putut stabili cu precizie necesarul zilnic de apă. Totuși, se consideră că adultul sănătos — care desfășoară o activitate moderată în climă temperată — are nevoie de 1 500—2 000 ml apă/zi. Nevoile cresc cu 500 ml/zi în caz de transpirație datorită climei calde sau activității intense și cu 500—1 500 ml/zi în caz de febră, vomismente, diaree. În anumite boli renale necesarul de apă este apreciat la 3 000 ml/zi. În toate aceste situații aportul de apă trebuie respectat și împlinit cu strictețe. Altfel, se produc modificări ale echilibrului hidric iar variația lui cu numai 1—2% conduce, în mod inevitabil, la boli grave sau chiar la moarte.

#### XIII.1.4.3. Excesul de apă

Ori de câte ori aportul de apă depășește capacitatea de excreție renală în organism se creează condiții pentru acumularea apei în exces. Această situație nu are loc în mod normal datorită bunei funcționări a hipofizei posterioare, rinichiului și adrenalelor.

Condițiile în care apa din organism se acumulează în exces sînt următoarele: (1) secreție mare de hormon antidiuretic (vasopresină) produs de



hipofiza posterioară; (2) insuficiență corticosuprarenaliană; (3) insuficiență renală acută; (4) boală de inimă congestivă (severă); (5) ciroza ficatului; (6) ingerare exagerată de lichide. Bineînțeles, acumularea excesivă determină și ea dezechilibrul apei, antrenând astfel tulburări grave în organism.

### XIII.1.5. PROCESELE HIDROELECTROLITICE

#### XIII.1.5.1. Ionizarea apei și produsul ionic al apei

La temperatura de 25° apa se află ionizată într-o proporție foarte mică (o moleculă din 555 milioane de molecule). Totuși această ionizare este suficientă ca să-i confere o conductibilitate electrică măsurabilă; la 25° conductibilitatea specifică a apei este de  $6 \times 10^{-8} \text{ ohm}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

Ecuatia de ionizare a apei este:  $\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HO}^-$  iar produsul ionic al apei are expresia:  $[\text{H}^+][\text{HO}^-] = 10^{-14}$ .

Datorită valorii produsului ionic al apei, se poate conchide că în apa pură, la 25°, concentrația ionilor  $\text{H}^+$ , egală cu cea a ionilor  $\text{HO}^-$ , este  $10^{-7}$  ion gram/L.

Produsul ionic al apei crește cu temperatura dar la aceeași temperatură el este invariabil, nu numai pentru apa pură ci și pentru orice soluție apoasă destul de diluată.

#### XIII.1.5.2. Reacția soluțiilor și unitățile ei de măsură

O soluție este *neutră*, ca apa pură, cînd cuprinde ioni  $\text{H}^+$  și ioni  $\text{HO}^-$  în aceeași concentrație. Deci la 25° în soluțiile neutre, ca și în apa pură:

$$[\text{H}^+] = [\text{HO}^-] = 10^{-7}$$

În soluțiile *acide* concentrația ionilor  $\text{H}^+$  este mai mare decît în apa pură și — implicit — decît concentrația ionilor  $\text{HO}^-$ :

$$[\text{H}^+] > 10^{-7} > [\text{HO}^-]$$

iar în soluții *bazice* situația este inversată:

$$[\text{HO}^-] > 10^{-7} > [\text{H}^+]$$

Ținând seama de faptul că între concentrația ionilor  $H^+$  și  $HO^-$  există relația dată de produsul ionic al apei, rezultă că fiecărei concentrații a ionilor  $HO^-$  îi corespunde o concentrație unică, bine determinată, a ionilor  $H^+$ , dată de relația :

$$[H^+] = \frac{10^{-14}}{[HO^-]}$$

Scăderea la jumătate sau dublarea concentrației ionilor  $H^+$  dintr-un mediu se manifestă prin creșterea, respectiv scăderea, valorilor pH corespunzătoare cu cîte 0,30 unități (tabelul XIII.4).

Tabelul XIII.4

Concentrațiile ionilor  $H^+$  și valorile pH corespunzătoare ale unor soluții

$[H^+]$ mmol/L	pH	$[H^+]$ mmol/l	pH
20	7,70	60	7,22
25	7,60	70	7,16
30	7,52	80	7,10
35	7,46	100	7,00
40	7,40	120	6,92
50	7,30	140	6,86
		160	6,80

Valorile pH ale unor fluide din organism precum și ale unor lichide folosite în alimentație sînt consemnate în fig. XIII.8.

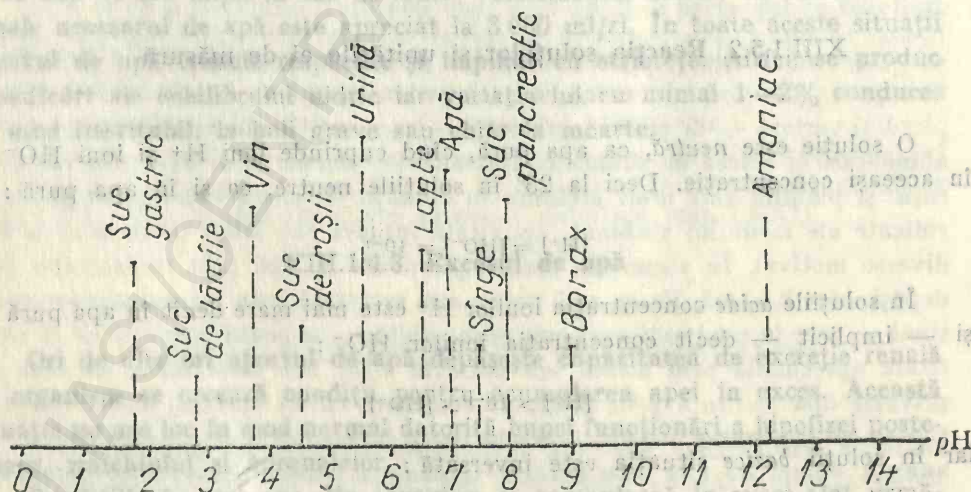


Fig. XIII.8 — Valorile pH ale unor lichide cunoscute.



### XIII.1.5.3. Procese biochimice fundamentale prin care se generează ioni $H^+$ în organism

Majoritatea proceselor metabolice din organism generează, direct sau indirect, cantități apreciable de ioni  $H^+$ , ceea ce face ca ele să fie considerate — în ansamblu — drept procese producătoare de acizi. Dintre acestea fac parte, în primul rând, căile metabolice fundamentale ale principiilor imediate (glucide, lipide, proteine).

Datorită acestei relații caracterizarea bazicității unei soluții se poate face și ea tot cu ajutorul concentrației ionilor  $H^+$ ; anume, în soluții bazice :  $[H^+] < 10^{-7}$ .

Folosirea valorilor concentrației ionilor  $H^+$ , care se scriu ca puteri negative ale lui 10, este însă incomodă. De aceea, în locul lor, pentru precizarea reacției soluțiilor se utilizează logaritmul cu semn schimbat al concentrației ionilor  $H^+$ , desemnat cu simbolul pH care este o prescurtare a expresiei *pondus hydrogenii* (= puterea hidrogenului). Deci :

$$pH = -\log [H^+].$$

Aceleași motive care au condus la introducerea mărimii pH au determinat și folosirea valorii pOH în locul concentrației ionilor  $HO^-$  :

$$pOH = -\log [HO^-].$$

Luând în considerare și aceste expresii, pH și pOH, rezultă că pentru definirea reacției unei soluții se pot folosi 4 mărimi, cele din coloana „unitatea de măsură” a tabelului XIII.3.

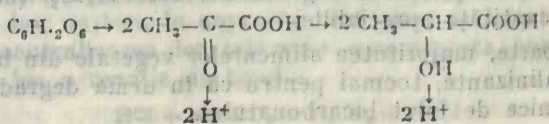
Tabelul XIII.3

Unitățile de măsură utilizate pentru aprecierea reacției unei soluții

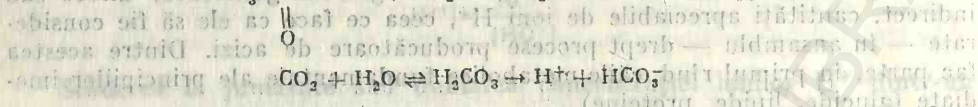
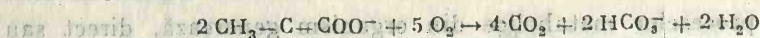
Unitatea de măsură	Reacția		
	acidă	neutră	alcalină
$[H^+]$	$> 10^{-7}$	$= 10^{-7}$	$< 10^{-7}$
$[HO^-]$	$< 10^{-7}$	$= 10^{-7}$	$> 10^{-7}$
pH	$< 7$	$= 7$	$> 7$
pOH	$> 7$	$= 7$	$< 7$

Dintre aceste unități, cea mai folosită pentru aprecierea reacției unei soluții este pH-ul.

a) Glicoliza, calea inițială de degradare a glucozei din metabolismul glucidic, conduce la formarea de acid piruvic sau de acid lactic. Fiecare moleculă de glucoză (cu 6 C) conduce la cîte două molecule din acești acizi (cu 3 C) și fiecare din ei eliberează prin disocierea carboxilului respectiv ioni  $H^+$  :

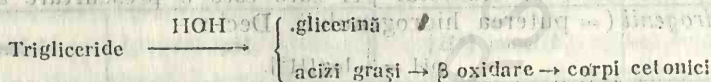


Mai mult decît atît, dacă degradarea glucozei este continuată pe calea aerobă are loc o producere suplimentară de protoni, provenind din acidul carbonic format, în cantitate apreciabilă, pe seama decarboxil rilor care au loc în cursul acestor procese. Global, se poate scrie :

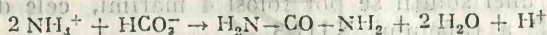


b)  n metabolismul lipidelor, degradarea trigliceridelor are ca rezultat încă de la prima etapă de desfacere hidrolitică a acestora   eliberarea acizilor gra  constitutivi. Ulterior, degradarea  $\beta$ -oxidativă a acizilor gra  duce la formarea corpurilor cetonice (acidul  $\beta$ -hidroxibutiric   acidul aceto-acetic) precum   la cantităţi apreciabile de dioxid de carbon care   ca  i în cazul precedent   generează ioni  $\text{H}^+$  din acidul carbonic corespunzător.

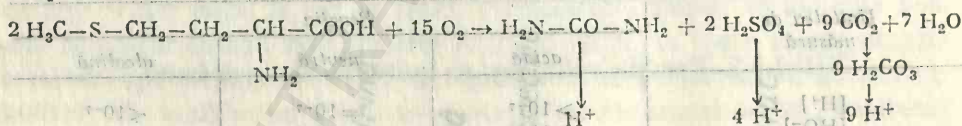
Schematic, producerea de  $\text{H}^+$  din lipide se poate arăta astfel :



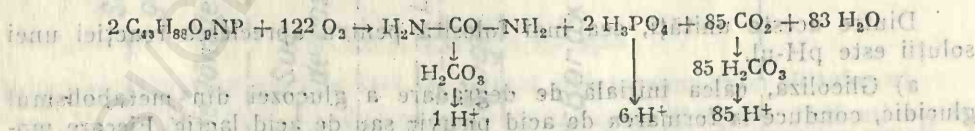
c)  n cazul metabolismului proteic, formarea ureei, ultimul catabolit al proteinelor în organismul omului, este un proces generator de acizi :



De asemenea, degradarea oxidativă a aminoacizilor, proveni i din proteine, este  i ea generatoare de acizi. Spre exemplu, din degradarea oxidativă a metioninei se eliberează, în final, cantităţi apreciabile de protoni. Global, se poate scrie astfel :



Hrana, datorită unor componenți alimentare, reprezintă  i ea o sursă de ioni  $\text{H}^+$  în organism. Astfel, prin oxidarea completă a lecitinei (fosfatidil-colinei) rezultă cantităţi considerabile de protoni. Reacția globală este :



Deși obținerea de baze în organism are loc în mai mică măsură, produsul final de oxidare în majoritatea degradărilor este  $\text{HCO}_3^-$  (bază anionică) ce se formează în cantităţi apreciabile.

Pe de altă parte, majoritatea alimentelor vegetale din hrană sînt considerate surse alcalinizante, tocmai pentru că în urma degradărilor generează  i ele baze anionice de felul bicarbonatului.



Ținând seama de cele menționate aici, se înțelege că organismul este confruntat în permanență cu numeroase tendințe acidifiante și alcalinizante care-i amenință păstrarea constantă a pH-ului mediului intern. Împotriva acestor tendințe organismul „se apără” prin utilizarea sistemelor tampon și prin alte mecanisme fiziologice.

#### XIII.1.5.4. Sistemele tampon

În organismul omului reacția mediului intern este ușor crescută peste neutralitate; pH: 7,35—7,45. Păstrarea acestor limite de variație este imperioasă pentru desfășurarea normală a tuturor proceselor vitale.

Mentținerea constantă a pH-ului în mediu intern este realizată de organism prin trei mecanisme funcționale:

- (a) eliminarea renală a excesului de acizi și baze;
- (b) eliminarea pulmonară a dioxidului de carbon (cel mai frecvent și abundent produs final de metabolism);

(c) neutralizarea acizilor și bazelor de către sistemele tampon. Funcționarea primelor două mecanisme este arătată la cooperarea între plămîni și rinichi pentru păstrarea echilibrului acido-bazic al singelui (în capitolul „Rinichiul și urina”). În cele ce urmează aici se expun numai mecanismele de funcționare ale principalelor sisteme tampon operante în organism.

Prin *tampon* se înțelege — în cazul de față — o substanță care prin prezența sa într-o soluție se opune modificării pH-ului determinată de adăusul unui acid sau al unei baze. Un *sistem tampon* este amestecul în soluție a două substanțe tampon cu acțiuni complementare în sensul că una din ele se opune scăderii pH-ului determinată de adăusul unui acid iar cealaltă se opune creșterii pH-ului determinată de adăusul unei baze. Aceste două substanțe din constituția oricărui sistem tampon pot fi: un acid slab și sarea sa alcalină sau o bază slabă și sarea sa acidă. Indiferent de natura ei chimică (acid, bază sau sare), componenta sistemului tampon care neutralizează acizii se numește *componentă bazică*, iar cea care neutralizează bazele este *componentă acidă*.

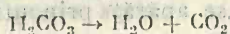
Cele mai importante sisteme tampon care funcționează permanent în organism sînt: (1) sistemul acid carbonic-bicarbonat, (2) sistemul fosfaților, (3) sistemul proteinelor și (4) sistemul hemoglobinei.

#### *Sistemul tampon acid carbonic — bicarbonat*

În cursul activității metabolice normale, majoritatea acizilor anorganici și organici care iau naștere în organism sînt acizi mai tari decît acidul carbonic. Pentru neutralizarea lor intervine componenta bazică a sistemului,  $\text{NaHCO}_3$  și are loc o reacție de tipul:

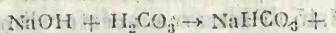


Bicarbonații, de felul  $\text{NaHCO}_3$ , nu sînt singurii în măsură să neutralizeze acizii dar ei intervin totdeauna în asemenea reacții din cauză că acidul carbonic rezultat se descompune ușor:



și dioxidul de carbon se elimină prin plămîni. Așadar, prin tamponare, bicarbonatul neutralizează acidul (mai tare decît  $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) transformîndu-l într-o sare neutră iar din bicarbonat rezultă dioxid de carbon care se elimină prin aerul expirat.

Pe de altă parte, cînd în organism se generează o bază tare, ca este neutralizată de componenta acidă a sistemului,  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , trecînd în bicarbonat (sare). Are loc o reacție de felul:



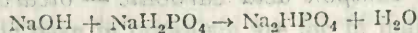
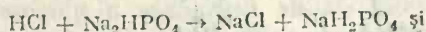
Deoarece dioxidul de carbon este produs încontinuu — ca ultim metabolit al majorității substanțelor transformate în organism — el este în permanență disponibil (sub formă de  $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) pentru tamponarea bazelor. În urma neutralizării corespunzătoare reacției de tamponare bazele tari trec în bicarbonat, cu bazicitate slabă.

Sistemul tampon acid carbonic — bicarbonat este cel mai răspîndit din punct de vedere cantitativ și funcționează eficient atît în lichidul extracelular cît și în plasmă. De aceea, pH-ul singelui depinde în primul rînd de concentrațiile componentelor acestui sistem tampon. În mod normal, în plasmă și lichidul extracelular raportul bicarbonat/acid carbonic este 20/1 și  $\text{pH} = 7,4$ . Cînd în sînge crește mult concentrația bicarbonatului sau scade apreciabil concentrația acidului carbonic, pH-ul depășește valoarea normală (7,35—7,45). Se spune că în acest caz s-a produs starea de *alcaloză*. În condiții inverse, pH-ul scade sub valoarea limită inferioară (7,35) și se declanșează starea anormală de *acidoză*.

### Sistemul tampon al fosfaților

Acest sistem este alcătuit din două săruri: fosfat monohidrogenat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  sau  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), care constituie componenta bazică a sistemului, și fosfat dihidrogenat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  sau  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), care este componenta acidă.

La pH-ul normal al singelui ( $=7,4$ ), concentrația fosfaților monohidrogenați este aproximativ de 5 ori mai mare decît a celor dihidrogenați. Funcționarea celor două tipuri de fosfați în procesul tamponării are loc potrivit reacțiilor:



După cum se observă, în prima reacție componenta bazică a sistemului a tamponat acidul tare, trecîndu-l într-o sare neutră iar fosfatul monohidrogenat (sare moderat bazică) s-a transformat în fosfat dihidrogenat (sare moderat acidă). În mod similar, potrivit ultimei reacții, tamponarea unei baze tari a constat în neutralizarea ei de către componenta acidă a sistemului

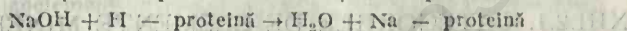
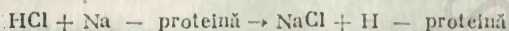


(sare moderat acidă). Din reacție a rezultat apa (neutră) și fosfat monohidrogenat care — așa cum s-a specificat mai înainte — este o sare moderat bazică.

Sistemul tampon al fosfaților este operant — în special — în hematii și în celulele tubulilor renali.

### Sistemul tampon al proteinelor

Acest sistem deși este predominant în celulele țesuturilor operează și în plasmă. În constituția lui intră proteine care funcționează ca anioni la pH-ul slab alcalin al mediului intern. În combinație cu ioni  $H^+$ , anionii proteici constituie componenta acidă a sistemului (H-proteină) și tamponează bazele iar în combinație cu cationii metalelor alcaline (Na, K) formează componenta bazică (Na-proteină sau K-proteină) și care tamponează acizii. Mecanismul tamponării în ambele cazuri poate fi redat prin reacțiile:

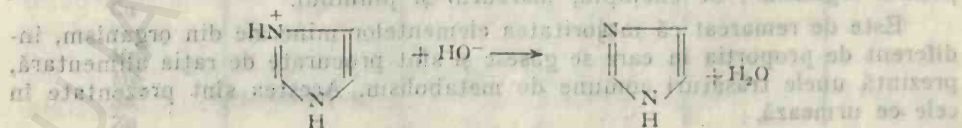
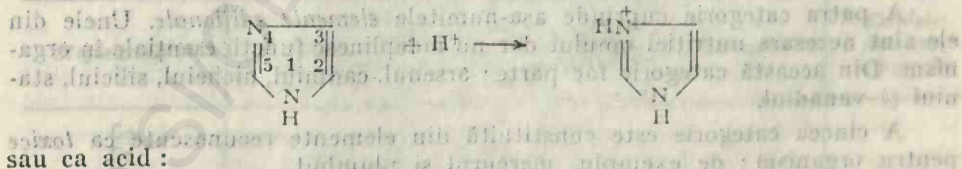


Se observă — și în cazul acesta — că prin tamponare acidul și baza tare au trecut în produși neutri ( $NaCl$  și  $H_2O$ ) iar componentele sistemului s-au transformat una în cealaltă. Fiecare din ele prezintă aciditate sau bazicitate moderată, astfel încît pH-ul mediului nu este afectat (cum ar fi fost, fără tamponare, în prezența  $HCl$  sau  $NaOH$ ).

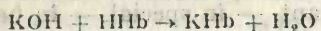
### Sistemul tampon al hemoglobinei

Sistemul tampon cu hemoglobină reprezintă un caz particular de sistem tampon cu componentă proteică. De fapt, hemoglobina intră în constituția a două sisteme tampon: (a) hemoglobină acidă ( $HHb$ ) — hemoglobinat de potasiu ( $KHb$ ) și (b) oxihemoglobină acidă ( $HHbO_2$ ) — oxihemoglobinat de potasiu ( $KHbO_2$ ).

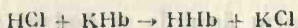
Ambele sisteme își pot exercita acțiunea tampon datorită faptului că hemoglobina cuprinde în partea sa proteică multe resturi de histidină. Într-adevăr, nucleul imidazolic din constituția histidinei are capacitatea să accepte și să cedeze  $H^+$  la unul din atomii de azot (cel din poziția 4) ai heterocicluului. Astfel, nucleul imidazolic funcționează ca bază:



Păstrind forma de scriere a reacțiilor de tamponare utilizată la celelalte sisteme tampon descrise anterior, în cazul sistemelor tampon din care face parte hemoglobina, reacțiile respective sînt :



și



Și de această dată, acidul și baza tare s-au transformat în urma tamponării în produși neutri (sare, apă). Totodată componentele sistemului au trecut una în cealaltă păstrînd aciditatea sau bazicitatea lor moderată, fără a fi afectat pH-ul mediului.

## XIII.2. ELEMENTELE MINERALE

### XIII.2.1. CATEGORIILE DE ELEMENTE MINERALE

#### DIN ORGANISM

Elementele minerale din corpul omului sînt grupate — în funcție de proporția în care se găsesc și de rolul îndeplinit — în 5 categorii :

În prima categorie sînt cuprinse cele mai importante elemente minerale care intră în compoziția apei și a tuturor constituenților organici. Ele sînt : carbonul, hidrogenul, oxigenul, azotul și sulful. Organismul își procură continuu aceste elemente prin apa și hrana ingerată, în special sub formă de compuși organici (glucide, lipide și proteine).

A doua categorie cuprinde : calciul, fosforul, magneziul, sodiul, potasiul și clorul. Aceste elemente îndeplinesc roluri fundamentale, atît din punct de vedere structural cit și funcțional. De aceea, este necesar ca rația alimentară să le procure zilnic, în cantități apreciable (mai mari de 100 mg/zi).

A treia categorie este cea a *oligoelementelor*. Ele poartă acest nume (în grecește, *oligo* = puțin) tocmai pentru că se află în organism în proporții foarte reduse : mai mici decît 0,05% din greutatea corpului. Principalele oligoelemente cu roluri structurale și funcționale sînt : cobaltul, cromul, cuprul, fierul, iodul, manganul, molibdenul, seleniul și zincul. Aportul alimentar de oligoelemente este și el foarte redus.

A patra categorie cuprinde așa-numitele *elemente adiționale*. Unele din ele sînt necesare nutriției omului dar nu îndeplinesc funcții esențiale în organism. Din această categorie fac parte : arsenul, cadmiul, nichelul, siliciul, staniul și vanadiul.

A cincea categorie este constituită din elemente recunoscute ca *toxice* pentru organism ; de exemplu, mercurul și plumbul.

Este de remarcat că majoritatea elementelor minerale din organism, indiferent de proporția în care se găsesc și sînt procurate de rația alimentară, prezintă unele trăsături comune de metabolism. Acestea sînt prezentate în cele ce urmează.



### XIII.2.2. METABOLISMUL GENERAL AL ELEMENTELOR MINERALE

Cu excepția sodiului și potasiului, majoritatea elementelor minerale importante din punct de vedere nutrițional — inclusiv oligoelementele din rație — se găsesc în hrană sau se constituie după ingerare sub formă de compuși relativ insolubili. De aceea, absorbția lor este întârziată și mai redusă. Pentru ușurarea absorbției, aceste elemente minerale necesită adesea proteine specifice de transport prin mucoasa intestinală.

Transportul ulterior prin sânge și depozitarea în organism a elementelor minerale necesită, de asemenea, proteine specifice cu rol de cărauş. În tabelul XIII.5, sînt menționate tipurile de compuși organici (proteine, aminoacizi) care servesc la transportul prin sânge al unor oligoelemente.

Tabelul XIII.5

#### Oligoelementele și particulele lor de transport prin sânge

Oligoelementul	Transferina	Albumina	Aminoacizii	Transcobalamina	Globulinele
Co				++	
Cr	+				
Cu		+			
Fe	++		(+)*		
Mn	+				++
Mo	(necunoscut)				
Se	(necunoscut)				
Zn	+	+			

\* (+) cantitate mică.

Excreția majorității elementelor minerale se face prin urină, sub formă de compuși solubili. Cu toate acestea, multe elemente sînt excretate și prin fecale. De asemenea, oligoelementele prezintă căi diferite de secreție — bilă, suc pancreatic — și de excreție (tabelul XIII.6).

Tabelul XIII.6

#### Căile obișnuite de excreție ale oligoelementelor

Oligoelementul	Bila	Urina	Sucul pancreatic	Transpirația	Cellulele mucoase eliminate
Co		++			
Cr	+	++			
Cu	++				
Fe					+
Mn	++				
Mo		+			
Se	(necunoscut)				
Zn	+	+	++	++	+

Necesarul zilnic de elemente minerale esențiale și oligoelemente este împlinit de majoritatea alimentelor aflate în hrana obișnuită. Surse deosebit de bogate sînt, : boabele cerealelor, legumele și fructele. Produsele lactate, carnea și peștele conțin cantități mai reduse de elemente minerale.

Trebuie subliniat faptul că aportul prin hrană al substanțelor minerale nu se reflectă totdeauna în nivelul concentrației lor din sînge. Într-adevăr, acest nivel sangvin depinde de măsura în care are loc absorbția și excreția elementului respectiv. Dar aceste procese sînt — la rîndul lor — sub dependența altor factori favorizanți sau inhibitori. Totuși, cunoașterea concentrației elementelor minerale în sîngele circulant este foarte utilă deoarece ea reflectă echilibrul existent între cantitățile : absorbită, utilizată, depozitată și excretată, din fiecare element.

O ultimă trăsătură comună, desprinsă din metabolismul general al elementelor minerale, se referă la deficitul și excesul acestor elemente în organism. Astfel, aportul insuficient al elementelor minerale esențiale conduce totdeauna la sindroame clinice bine conturate de deficiență. În genere, aceste sindroame sînt rar întîlnite căci rația alimentară completă împlinește necesarul organismului. Cînd apare totuși deficiența vreunui element, ea este de natură secundară și se datorează tulburărilor de absorbție sau pierderilor excesive (de exemplu, deficiență de fier în sîngerări masive, deficiență de calciu în anumite boli renale).

Pe de altă parte, aportul excesiv din majoritatea elementelor minerale determină totdeauna simptome de toxicitate, manifestate în multiple și variate forme. De asemenea, elementele a căror absorbție se face discontinuu și sub control riguros pot declanșa simptome de gravă toxicitate cînd intervin diverși factori care le tulbură sau chiar le împiedică absorbția.

Din categoriile de elemente minerale menționate anterior, la clasificare, în cele ce urmează vor fi prezentate numai cele din categoria a II-a și a III-a deoarece aceste elemente îndeplinesc roluri importante — structurale și funcționale — în organism.

### XIII.2.3. CALCIUL

Calciul este cel mai abundent element mineral din organism. În corpul unui om adult de 70 kg se găsește cca 1,2 kg calciu. Cel puțin 99% din cantitatea totală de calciu din organism este fixată în oase și dinți sub formă de hidroxilapatită,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . În afară de aceasta, calciul din oase se mai găsește și sub formă de fosfat amorf sau de carbonat. Toate sărurile minerale ale calciului din oase sînt depozitate pe matricea lor organică în structuri bine organizate (vezi țesutul osos). Restul calciului din organism (mai puțin de 10 g) este distribuit în lichide și țesuturi moi. Astfel, în ser se găsesc în mod normal 9—11 mg calciu în 100 ml, în lichidul cefalorahidian 4,5 mg calciu pentru 100 ml iar, în mușchi 70 mg și în nervi 15 mg calciu pentru 100 g țesut.



### XIII.2.3.1. Sursele alimentare de calciu

Alimentele cele mai bogate în calciu sînt: laptele și produsele lactate, gălbenușul de ou, carnea, legumele: fasolea (verde și boabe), mazărea (boabe), morcovii, țelina, castraveții, varza; fructele (în special, merele).

### XIII.2.3.2. Metabolismul calciului

Calciul provenit din alimentele ingerate este absorbit la nivelul intestinului subțire cu ajutorul unei proteine. Această proteină care fixează calciul și îi înlesnește trecerea prin peretele intestinal este sintetizată, în măsura necesară, sub acțiunea unui derivat al vitaminei D<sub>3</sub>, anume 1,25-dihidroxi-colecalciferolul. De asemenea, vitaminele A, C și D (ca atare) precum și hormonul paratiroidian favorizează absorbția calciului.

Este de remarcat însă că absorbția intestinală a calciului se face numai în proporție de 20—30% din cantitatea totală de calciu ingerat. Aceasta se datorează prezenței în intestin a numeroși anioni cu care ionii de calciu formează ușor săruri insolubile (oxalați, fitați, fosfați) și grăsimilor nedigerate cu care formează săpunuri insolubile de calciu. Pe de altă parte, absorbția intestinală a calciului este inhibată de calcitonină. Se înțelege că, în aceste condiții, o mare parte din calciul ingerat (cca 16 mMol/zi) este excretat prin fecale. Din calciul absorbit și trecut în circulație se elimină prin urină (deci sub forme hidrosolubile) cca 4 mMol/zi. Spre deosebire de eliminarea intestinală a calciului care variază în raport cu natura celorlalți componenți ai rației (mai mult sau mai puțin favorizanți pentru generarea de compuși insolubili), cantitatea de calciu eliminat prin urină se menține constantă, într-un organism sănătos. Mici cantități de calciu se elimină și prin transpirație.

### XIII.2.3.3. Rolul metabolic

Principală funcție structurală a calciului în organism este de a coopera cu fosforul (de fapt, cu anionii fosforici) pentru constituirea și menținerea în bună stare a oaselor și a dinților. S-a stabilit că aceasta se realizează în condiții optime cînd cantitatea de calciu este de 2,5 ori mai mare decît cea de ioni fosforici (notați simbolic cu P). Aceasta înseamnă că în oase, raportul Ca/P trebuie să fie  $2,5/1 = 2,5$ . De asemenea, pentru îndeplinirea rolului său structural în oase și dinți, calciul mai necesită prezența magneziului și a vitaminelor A, C și D.

În organism, calciul mai participă la procesul coagulării singelui, la permeabilitatea membranelor celulare, în contracția musculară, în transmitia impulsului nervos, la utilizarea fierului, la activitatea unor enzime, în secreția

gastrică (gastrina) și în stimularea ritmului cardiac (activitate antiaritmică). În sfârșit, studii recente au pus în evidență acțiunea protectoare a calciului contra efectelor nocive ale stronțului radioactiv ( $^{90}\text{Sr}$ ).

Intervenția calciului în multiplele procese biochimice și fiziologice citate trebuie considerată analogă celei exercitate de „un al doilea mesager”. Într-adevăr, calciul mediază răspunsurile celulare la un număr mare de stimuli, cu totul asemănător acțiunii reglatoare efectuată de nucleotidele ciclice. De fapt, s-a dovedit că intervenția calciului în procesle menționate este mediată de o proteină receptoare celulară, numită calmodulină. Aceasta leagă ionii de calciu cînd concentrația lor crește, ca răspuns la un anumit stimul. Odată fixați de calmodulină, ionii  $\text{Ca}^{2+}$  reglează diverse procese precum și activitatea multor enzime importante. Printre ele se numără și enzimele implicate în metabolismul nucleotidelor ciclice, în contracția musculară, în metabolismul glicogenului.

Cu privire la capacitatea calciului de a forma combinații complexe cu unele substanțe organice, este de remarcă că acestea îndeplinesc în organism rolul de a scoate ionii  $\text{Ca}^{2+}$  din celule. Unele cercetări recente au dovedit că pot exista și compuși organici chelatori, de felul medicamentului românesc *Rodilemid*, care după ce fixează ionii  $\text{Ca}^{2+}$  îndeplinesc procesul invers, de introducere lor în celule. Ca urmare a unei asemenea intervenții crește concentrația calciului celular și sînt favorizate procesele metabolice în care este implicat acest element.

#### XIII.2.3.4. Necesarul de calciu

Pentru realizarea rolurilor importante ale calciului în organism este necesar un aport zilnic alimentar de cca 800 mg (20 mMol) calciu. Această cantitate necesară adultului sănătos este mărită în perioada de creștere (1200 mg Ca/zi la adolescenți) și în situații de sarcină sau alăptare (1 200—1 400 mg Ca/zi). Prin laptele matern se secretă zilnic 250 mg Ca. De asemenea, la persoanele în vîrstă necesarul de calciu este crescut (cca 1 000 mg).

#### Deficiența și excesul calciului în organism

Aportul alimentar insuficient sau lipsa oricărui factor favorizant al absorbției calciului din rația ingerată pot antrena numeroase tulburări și simptome de deficiență în acest element atât de necesar organismului. Un prim simptom al deficienței de calciu este tetania, caracterizată prin crampe musculare, amorțiri și zădărnici în brațe sau picioare. Deficiențele moderate pot determina insomnii, iritabilitate neuromusculară, palpitații, carii dentare. Deficiențele mai marcate pot conduce la malformații osoase, determinînd rahitismul la copii și osteomalacia la adulți. În acest ultim caz se constată o mobilizare mai accentuată a calciului din oase și din alte organe, comparativ cu ritmul și cantitatea de calciu depusă. În cazurile de gravă deficiență,



pe lingă porozitate și fragilitate osoasă, se constată frecvent întârzieri în timpul de coagulare a sîngelui și hemoragii. În sfîrșit, diverse tulburări cardiovasculară, artrită și unele simptome asociate cu senescența (dureri osoase, fragilitate dentară, tremurături) se datorează tot deficienței calciului din organism.

Aportul alimentar excesiv de calciu contribuie direct — prin absorbție substanțială — la creșterea concentrației de calciu în ser, peste limita superioară de variație normală. Aceasta creează în organism o stare de toxicitate manifestată prin tulburări clinice caracteristice: hiperparatiroidism și intoxicații cu vitamina D.

### XIII.2.4. FOSFORUL

După calciu, fosforul este cel mai abundent element mineral din organism, aflîndu-se în toate celulele. Concentrația fosforului în organism reprezintă 1% din greutatea corpului, ceea ce înseamnă că la adult se găsește circa 600—700 g fosfor (sub formă de diverși fosfați anorganici și organici). Din această cantitate totală, 85% intră în constituția scheletului, 6% în mușchi iar 9% în nervi și sînge. Apreciată în mEq/L, concentrația plasmatică a fosforului este 1,15 (= 3,56 mg/100 ml). Această concentrație suferă variații circadiene în funcție de ritmul în care este secretat hormonul paratiroidian. De asemenea, concentrația plasmatică a fosforului variază în funcție de aportul glucidelor din rație; cu cît aportul acestora este mai mare, cu atît concentrația fosforului din plasmă se micșorează. Faptul se explică prin utilizarea fosforului în procesul de trecere a glucozei în glicogen (vezi metabolismul glucidelor).

În celule fosforul se află sub formă de ioni fosfat; atît liber — în concentrație de cîtiva mEq/L — cît și combinat, intrînd în constituția acizilor nucleici, fosfolipidelor și a unor proteine. În spațiul extracelular ionul fosfat circulă liber. Datorită faptului că în celule există numeroase enzime care scindează ușor esterii fosforici și anhidridele fosforice, celulele și spațiile extracelulare dispun — în permanență — de anioni fosforici liberi, atît de necesari în diverse reacții metabolice.

#### XIII.2.4.1. Sursele alimentare de fosfor

Aportul zilnic de fosfor dietar obișnuit este apreciat la 800—900 mg, fiind procurat atît din surse vegetale (nuci, semințe, boabe de cereale, boabe de mazăre și de fasole, cartofi, morcovi), cît și din surse de origine animală (carne, pește, pui, ouă).

### XIII.2.4.2. Metabolismul fosforului

Absorbția fosforului din hrana ingerată se face, în special, în intestinul subțire (fiind maximă în jejun) și, în mai mică măsură, la nivelul colonului. Absorbția ionilor fosforici este stimulată de prezența vitaminei D, a sodiului și de creșterea pH-ului în suc digestiv (de la 3,3 la 7,9). Intervenția vitaminei D în absorbția intestinală a fosforului se realizează — mai cu seamă — prin derivatul său 1,25-dihidrocolecalfiferol. De fapt, există o strinsă interdependență între nivelul fosfatului seric și acest derivat activ de vitamină D<sub>3</sub>. Într-adevăr, cînd nivelul fosfatului seric scade foarte mult (este anormal de scăzut) se stimulează în tubuli renali formarea de 1,25 dihidrocolecalfiferol și astfel se determină creșterea absorbției fosfatului din intestin. În prezența unor cantități excesive de Fe, Al și Mg absorbția fosforului este redusă din cauza formării de fosfați insolubili cu aceste metale.

Din organism ionii fosforici (fosfații solubili) în exces sînt eliminați pe cale renală, sub control hormonal complex: hormon paratiroidian, calcitonină, estrogeni, tiroxină. La nivelul glomerulului renal se filtrează cca 85—90 % din fosfatul plasmatic iar cantitatea excretată reprezintă diferența dintre cea filtrată și cea reabsorbită în regiunile proximală și distală a tubulilor renali. Reabsorbția fosfatului — ca și a calciului — este stimulată la acest nivel de 1,25-dihidrocolecalfiferol. Efectul acestuia este însă contracarat de hormonul paratiroidian. Cînd — din vreo cauză oarecare — hormonul paratiroidian nu-și exercită acțiunea, rinichiul răspunde numai acțiunii 1,25-dihidrocolecalfiferolului, conservînd întreg fosfatul din filtratul renal. Se apreciază că în mod normal, prin rinichi se excretă 500—600 mg P/zi. Prin fecale se excretă mai puțin (200—300 mg P/zi) iar prin transpirație și mai puțin (sub 25 mg P/zi).

### XIII.2.4.3. Rolul metabolic

În organism fosforul (sub formă de ioni fosforici sau de fosfați, ca atare) îndeplinește roluri deosebit de importante. Într-adevăr, așa cum s-a menționat și la calciu, fosforul intră în constituția oaselor și a dinților; în special sub formă de hidroxilapatită. S-a mai precizat, la prezentarea calciului, că menținerea în stare bună de funcționare a oaselor necesită respectarea raportului Ca/P = 2,5/l. În organismul sănătos acest echilibru se păstrează sub reglare hormonală complexă, atît a aportului cît și a eliminării ionilor respectivi.

Fosforul mai este implicat în numeroase reacții metabolice interesînd biosinteza și utilizarea zaharurilor sau a lipidelor pentru procurare de energie precum și folosirea proteinelor pentru creștere și refacere tisulară. Pe de altă parte, fosforul este un constituent principal al acizilor nucleici. El participă, de asemeni, la stimularea contracției musculare (inclusiv, la contracția ritmică a mușchiului cardiac) și este necesar pentru păstrarea activității nervoase. În sfîrșit, cu rol structural, fosforul participă la formarea coenzimelor rezultate din anumite vitamine hidrosolubile și intră în constituția unor sisteme tampon care — așa cum s-a arătat — participă la păstrarea echilibrului acido-bazic în organism.



### XIII.2.4.4. Necesarul de fosfor

Pentru îndeplinirea rolurilor multiple și atât de importante ale fosforului în organism, se apreciază că necesarul zilnic, la adulți, este de 800 mg P. În anumite stări fiziologice (sarcină, alăptare) necesarul de fosfor ajunge până la 1 200 mg P/zi.

#### Deficiența și excesul de fosfor în organism

Aporturile insuficiente de fosfor atrag numeroase consecințe grave pentru organism. De asemenea, absorbția redusă sau eliminarea excesivă prin rinichi determină și ele fenomene de depleție. În asemenea situații se modifică — în primul rând — raportul Ca/P, ceea ce atrage tulburări în formarea și calitatea oaselor sau a dinților. În al doilea rând, deficiența de fosfor împiedică dezvoltarea iar la adult declanșează tulburări foarte variate: slăbire, obezitate, astenie (fizică și mentală), manifestări nervoase, căderea dinților, artrită, anomalii celulare. Acestea din urmă se întâlnesc, în special la eritrocite, leucocite și plachete.

De curând, unele cercetări biochimice au dovedit că fosforul părăsește celulele canceroase mai ușor decât pe cele normale. Pentru acest motiv, printre alte măsuri de prevenire a cancerului se numără și administrarea de fosfor. Însă tratamentele cu fosfor trebuie foarte bine conduse și controlate pe parcurs pentru a nu se ajunge la constituirea stărilor de hiperfosfatemie.

Hiperfosfatemia nu se întâlnește decât foarte rar. Ea apare totuși în diverse stări patologice ale rinichiului (scăderea filtratului glomerular și creșterea reabsorbției tubulare), în urma perfuziilor cu fosfați, în stări de hipertermie, în distrugerii tisulare. Adesea, hiperfosfatemia este asociată cu scăderea concentrației calciului în ser. Acest fapt este consecința directă a efectului reglator exercitat de către fosfor asupra producerii de 1,25-dihidroxicolecalciferol.

### XIII.2.5. MAGNEZIUL

Deși în organism magneziul se află în proporție mică (0,05%, din greutatea totală a corpului) acest element prezintă o mare importanță atât din punct de vedere structural cit și funcțional. Cantitatea totală de magneziu din corpul omului este de cca 23 g (reprezentînd 1 800 mEq). Din această cantitate, cca 70% (14 g) se află în oase, împreună cu Ca și P. Restul de magneziu din organism (30%) este răspândit în diferite fluide din corp și în țesuturi. În plasmă magneziul se află în proporție de 14—33 mg/L (adică 1,2-2,8 mEq/L). Din concentrația totală plasmatică, 25% este legat de proteine iar 75% se află sub formă de ioni liberi ( $Mg^{2+}$ ). O cantitate apreciabilă de magneziu este cuprinsă în eritrocite (5,2 mEq/L). În ceea ce privește distribuția celulară a magneziului, cea mai mare parte se află în mitocondrii și nucleu. O cantitate de 70% din magneziul celular este legat de proteine.

### XIII.2.5.1. Sursele alimentare de magneziu

Magneziul este mult răspândit în legumele verzi, drept constituent al clorofiliei. Alte surse bogate în magneziu sînt: cerealele (grîu, porumb), fasolea, soia, semințele oleaginoase, fructele (smochine, nuci, mere), carnea (ficat, creier, rinichi, splină), pește marin, scoici.

### XIII.2.5.2. Metabolismul magneziului

Din aportul zilnic al magneziului alimentar (cca 350 mg) se absoarbe aproximativ 60%; în special, la nivelul intestinului subțire. Totdeauna, proporția de magneziu absorbită este în raport invers cu cantitatea ingerată. Astfel, dintr-o rație cu puțin magneziu se absoarbe mai mult de 3/4 iar dintr-o rație cu conținut bogat în acest element nu se absoarbe decît 1/4. Este de remarcat că absorbția magneziului este influențată și de alți factori, foarte diferiți: proporțiile de calciu, fosfor, lactoză, proteine, acizi grași, acid fitic (provenind din alimente și aflate în intestin), ritmul de absorbție al apei precum și reglajul hormonal (hormonul paratiroidian, aldosterona, calci-tonina, vasopresina, somatotropina). Vitamina D înlesnește absorbția magneziului cînd el nu se găsește în prezența unor cantități apreciable de calciu ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Natura acidă sau alcalină a regimului alimentar influențează și ea absorbția magneziului în sensul că dacă regimul este alcalinizant, absorbția magneziului scade mult.

Excreția normală a magneziului se face prin urină în proporții apreciable (6—20 mEq, reprezentînd 70—230 mg). Totuși, rinichiul are o mare capacitate de a conserva ionii  $\text{Mg}^{2+}$  astfel încît excreția zilnică, în cazul unei rații alimentare sărace în acest element, este de numai 1 mEq. Cînd rația este obișnuită (deci are un conținut adecvat de Mg) cantitatea de magneziu excretată prin urină reprezintă 35—45% din cea ingerată. Asupra excreției urinare de magneziu se exercită un control hormonal riguros: aldosterona o favorizează iar parathormonul mărește reabsorbția. Creșterea marcată a excreției de magneziu este determinată de folosirea sistematică a diureticelor sau prin consum de alcool.

### XIII.2.5.3. Rolul metabolic

Pe lîngă rolul său plastic, drept constituent al oaselor și al unor țesuturi moi, magneziul îndeplinește în organism numeroase roluri funcționale. Aflîndu-se în toate celulele, activează — sub formă de ioni  $\text{Mg}^{2+}$  — numeroase enzime participante la metabolismul intermediar al tuturor categoriilor de principii imediate (glucide, lipide, proteine). Pe de altă parte, magneziul promovează absorbția și metabolismul altor substanțe minerale; în special, pentru calciu, fosfor (fosfat), sodiu și potasiu. Magneziul ajută și la utilizarea vitaminelor (complex B, C și E) în organism. De asemenea, magneziul este implicat în excitabilitatea neuromusculară. La nivelul inimii, magneziul exercită efect antiaritmîc și protector față de leziunile aterosclerotice.



#### XIII.2.5.4. Necesarul de magneziu

Se consideră că necesarul zilnic de magneziu al adultului este cuprins între 300 mg (pentru femei) și 350 mg (pentru bărbați). În perioadele de sarcină, alăptare și creștere, necesarul zilnic este mărit, ajungând pînă la 450 mg.

#### *Deficiența și excesul de magneziu în organism*

Aportul alimentar insuficient de magneziu, absorbția lui diminuată în mod apreciabil sau tulburări de resorbție determină simptome de deficiență ușor de recunoscut (tremurături, dezorientare, confuzie, teamă). Deficiența are și efecte grave la nivelul unor organe. Astfel, la nivelul coronarelor, din cauza scăderii conținutului în magneziu (cu 5—25%) se induce o retenție marcată a calciului și sodiului, ceea ce antrenează modificări ale pereților vasculari. Au loc și tulburări de ritm cardiac precum și calcifieri arteriale. Pe de altă parte, scăderea concentrației magneziului sub limită — însă cu păstrarea normală a concentrației calciului — determină un gen de spasmofilie (prin hipomagnezemie). Tot datorită deficienței de magneziu se produc tulburări de ritm cardiac și la diabetici în cazurile de cetoacidoză severă caracteristică pentru coma diabetică. Simptomele deficienței de magneziu se întîlnesc și la bolnavii cu pancreatite sau cu alcoolism cronic. În sfîrșit, diareea prelungită și vărsăturile incoercibile determină și ele o marcată deficiență de magneziu.

Situația opusă deficienței, hipermagnezemia, se întîlnește rar. Numai în cazul unor boli renale, cînd excreția magneziului este mult stînjinită, se declanșează stări de toxicitate datorate hipermagneziei. Acestea se manifestă, în special, prin efect depresiv la nivelul sistemului nervos central.

#### XIII.2.6. SODIUL

Unul din cele mai importante elemente minerale din organism este sodiul. El se află, mai cu seamă, în spațiul extracelular din țesuturi și în fluidele corpului.

În organismul unui adult se găsesc cca 90 g (3 910 mEq) sodiu din care, majoritatea — 1 720 mEq — se află în spațiul extracelular. Această cantitate reprezintă o concentrație de 135—145 mEq/L, adică de 10 ori mai mare decît concentrația intracelulară a sodiului (10—30 mEq/L). În plasmă, concentrația normală a sodiului este de 142 mEq/L.

#### XIII.2.6.1. Sursele alimentare de sodiu

Majoritatea alimentelor de origine animală și vegetală aflate în rație cuprind sodiu sub formă de clorură. Mai mult sodiu se află în alimentele de origină marină, în carnea de vită, în carnea de pui și în anumite legume (sfeclă, morcovi).

### XIII.2.6.2. Metabolismul sodiului

Sodiul din alimentele ingerate este absorbit ușor; în special, la nivelul intestinului subțire. Singele îl duce în tot organismul iar la nivelul rinichiului, în urma filtrării, suferă resorbție astfel încât concentrația sodiului în sange se menține constantă.

Excesul de sodiu, care poate ajunge pînă la 90—95% din cantitatea ingerată, se excretă prin urină. Datorită acestui fapt, nivelul sodiului urinar permite aprecierea cantității de sodiu ingerat. În mică măsură, sodiul se excretă prin transpirație (15—20 mEq în 24 ore) și prin fecale (10 mEq/24ore).

### XIII.2.6.3. Rolul metabolic

Cele mai importante roluri ale sodiului în organism sînt în relație directă cu păstrarea principalelor echilibre fiziologice. Astfel, împreună cu potasiul, sodiul participă la reglarea echilibrului apei. Pe de altă parte, așa cum s-a arătat la „sistemele tampon” (vezi subcapitolul precedent), sodiul joacă rol important în păstrarea echilibrului acido-bazic. De asemenea, sodiul participă la păstrarea echilibrului ionic și a excitabilității neuromusculare. În acest ultim caz este necesar să se mențină un raport bine echilibrat între ionii de sodiu, potasiu, calciu și magneziu.

Este de remarcat faptul că distribuția predominantă a sodiului în spațiul extracelular și în fluidele corpului se datorează unui mecanism activ exercitat la nivelul membranei celulare, numit „pompa de sodiu”.

Funcționarea pompei de sodiu este schematizată în fig. XIII.9.

După cum reiese din fig. XIII.9, sodiul din citoplasmă pătrunde în membrana celulară, pe seama energiei eliberate la desfacerea unei legături macroergice dintr-o moleculă de ATP.

Rolul principal pentru pompare îl împlinește pe de o parte, ATP-aza — enzima care scindează hidrolitic ATP-ul — iar pe de altă parte, fosfolipidele membranare. Într-adevăr ATP-aza de la suprafața celulei, pe lângă activitatea sa hidrolazică, are și funcția de receptor pentru cuplul ionilor  $\text{Na}^+$  și  $\text{K}^+$ . Ca urmare a dublei sale intervenții în acest proces, ionii de sodiu pătrund în membrană iar digliceridele fixează restul fosforic eliberat din ATP și, sub acțiunea digliceratkinazei, se transformă în acizi fosfatidici. Aceștia se salifică — pentru un moment — cu ionii de sodiu. Ulterior, prin intervenția unei fosfataze, sărurile de sodiu ale acizilor fosfatidici se hidrolizează, ionii  $\text{Na}^+$  trec în spațiul extracelular, restul de acid fosforic intră în citoplasmă unde — împreună cu ADP-ul — reface ATP-ul iar digliceridele membranare se reconstituie, ajungînd din nou apte pentru reluarea procesului.



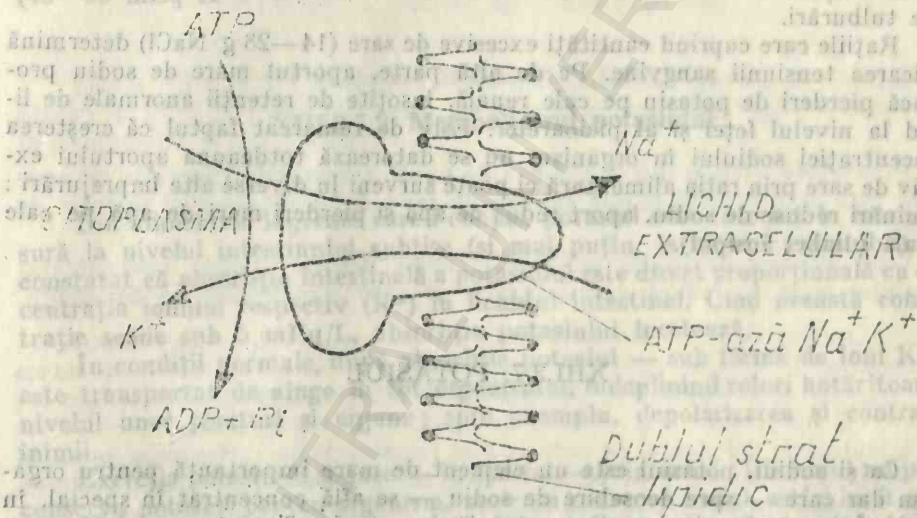
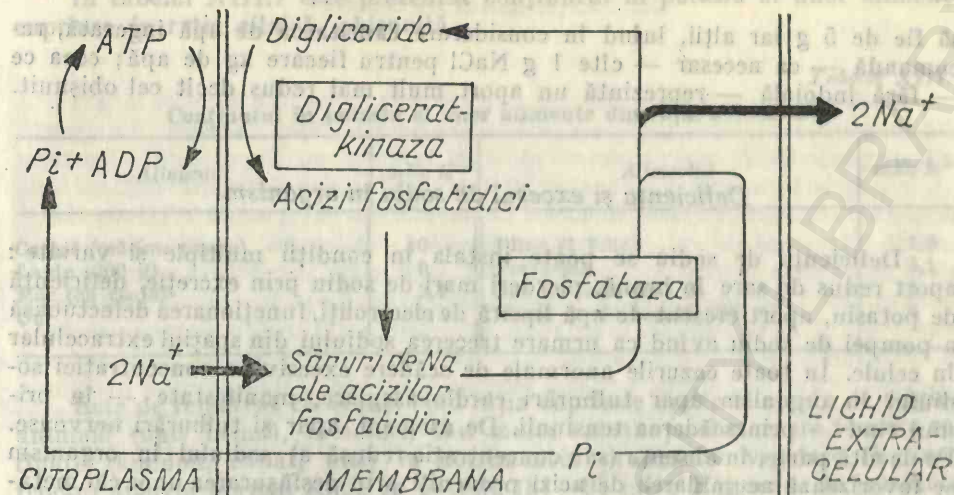


Fig. XIII.9. — Pompa de sodiu: (a) reprezentarea clasică, (b) reprezentare modernă.

Concomitent cu ionii  $\text{Na}^+$ , ionii  $\text{K}^+$  — prin același mecanism activ, realizat de aceiași participanți la pompare — parcurg calea inversă a ionilor de sodiu și trec astfel din spațiul extracelular în interiorul celulei unde se acumulează.

#### XIII.2.6.4. Necesarul de sodiu

Rația zilnică obișnuită procură 3—7 g sodiu, sub formă de clorură (6—18 g  $\text{NaCl}$ ), ceea ce asigură cu prisosință necesarul organismului. Actualmente, unii cercetători consideră că aportul zilnic de clorură de sodiu trebuie

să fie de 5 g iar alții, luînd în considerare cantitatea de apă ingerată, recomandă — ca necesar — cite 1 g NaCl pentru fiecare kg de apă; ceea ce — fără îndoială — reprezintă un aport mult mai redus decît cel obișnuit.

### *Deficiența și excesul de sodiu în organism*

Deficiența de sodiu se poate instala în condiții multiple și variate: aport redus de sare în hrană, pierderi mari de sodiu prin excreție, deficiență de potasiu, aport crescut de apă lipsită de electroliți, funcționarea defectuoasă a pompei de sodiu avînd ca urmare trecerea sodiului din spațiul extracelular în celule. În toate cazurile anormale de scădere excesivă a concentrației sodiului în organism apar tulburări cardiovasculare, manifestate — în primul rînd — prin scăderea tensiunii. De asemeni, apar și tulburări nervoase. Pe de altă parte, în absența (sau concentrația redusă a) sodiului în organism se favorizează acumularea de acizi proveniți prin desfășurarea unor căi metabolice obișnuite. La rîndul lor, acești acizi acumulați antrenează diverse alte tulburări.

Rațiile care cuprind cantități excesive de sare (14—28 g NaCl) determină ridicarea tensiunii sangvine. Pe de altă parte, aportul mare de sodiu provoacă pierderi de potasiu pe cale renală, însoțite de retenții anormale de lichid la nivelul feței și al picioarelor. Este de remarcat faptul că creșterea concentrației sodiului în organism nu se datorează totdeauna aportului excesiv de sare prin rația alimentară ci poate surveni în diverse alte împrejurări: eliminări reduse de sodiu, aport redus de apă și pierderi mari de apă pe cale renală (diabet insipid).

## XIII.2.7. POTASIUL

Ca și sodiul, potasiul este un element de mare importanță pentru organism dar care — spre deosebire de sodiu — se află concentrat în special, în celule. Într-adevăr, din cantitatea totală de potasiu aflată în corp (150 g sau 3 500 mEq K<sup>+</sup> la adultul de 70 kg), 98% intră în compoziția lichidului intracelular. Cantitatea redusă (2%) de potasiu extracelular se află distribuită mai mult în lichidul interstițial și numai o mică porție (4,7 mEq/L) se află în plasmă.

### XIII.2.7.1. Sursele alimentare de potasiu

Cele mai bogate surse alimentare de potasiu sînt: legumele (în special, tomatele și cartofii), boabele de cereale, semințele de floarea soarelui și fructele (bananele, portocalele, merele, strugurii).



În tabelul XIII.7 este prezentat conținutul în potasiu al unor alimente cuprinse în rația zilnică, obișnuită.

Tabelul XIII.7

Conținutul în potasiu al unor alimente din rația obișnuită

Alimentul	mEq K <sup>+</sup>	Alimentul	mEq K <sup>+</sup>
Cartof (mărime medie)	10	Pline (1 felie)	1,6
Lapte (200 g)	9	Portocală	5,1
Măr (cu coajă)	3,4	Suc de roșii (200 g)	14
Ou	1,8	Varză crudă tocată (200 g)	6

Este de remarcat că atunci când rația cuprinde multe alimente de origine animală (unt, brinză, mezeluri) sau multe substanțe alimentare ternare rafinate (amidon, zahăr, ulei) în detrimentul produselor vegetale (legume, fructe) aportul normal zilnic de potasiu (81—95 mEq K<sup>+</sup>) scade la jumătate (40—50 mEq K<sup>+</sup>).

### XIII.2.7.2. Metabolismul potasiului

Din alimentele ingerate care-l conțin, potasiul este absorbit în mare măsură la nivelul intestinului subțire (și mai puțin, la nivelul colonului). S-a constatat că absorbția intestinală a potasiului este direct proporțională cu concentrația ionului respectiv (K<sup>+</sup>) în lichidul intestinal. Când această concentrație scade sub 5 mEq/L, absorbția potasiului încetează.

În condiții normale, după absorbție potasiul — sub formă de ioni K<sup>+</sup> — este transportat de sânge în tot organismul, îndeplinind roluri hotărâtoare la nivelul unor țesuturi și organe; spre exemplu, depolarizarea și contracția inimii.

Excreția potasiului se face — în special — prin urină. Rinichiul nu poate conserva potasiul pentru organism, așa cum conservă sodiul, astfel încât zilnic se pierde prin urină cca 40 mEq (adică 160 mg K<sup>+</sup>). În cazul anumitor boli de rinichi, pierderea aceasta, obișnuită, de potasiu poate fi mult mai mare. Excreția urinară a potasiului se face sub reglaj hormonal, fiind stimulată de aldosteronă. Aportul mărit de sodiu, alcoolul și cafeaua determină excreție suplimentară de potasiu prin urină. De asemenea, în anumite cazuri patologice (dezechilibru sodiu/potasiu, diaree prelungită, transpirații excesive, vomisme, malnutriție severă, folosirea exagerată a diureticilor) se constată pierderi masive de potasiu din organism. Este de remarcat că tratamentele hormonale cu cortizon sau aldosteronă determină excreție mărită de potasiu dar nu și excreția corespunzătoare de sodiu. Dimpotrivă, în asemenea cazuri sodiul este reținut în organism și se tulbură astfel echilibrul normal (1/1) al acestor două elemente, ceea ce atrage numeroase dereglări funcționale.

În mică măsură potasiul este excretat prin respirație și prin fecale.

### XIII.2.7.3. Rolul metabolic

În organism, potasiul este necesar pentru buna desfășurare a tuturor metabolismelor, intervenind ca activator enzimatic. Spre exemplu, în această calitate participă la transformarea glucozei în glicogen. S-a calculat că pentru 1 g glicogen format se consumă 0,36 mMol  $K^+$ . Datorită intervențiilor sale metabolice, potasiul este considerat element esențial pentru creștere. Într-adevăr, formarea de celule noi este asociată totdeauna cu retenția de potasiu în celulă; pentru 1 g azot proteic încorporat în structura unei celule se rețin cca 3 mMol K. De asemenea, potasiul participă la sinteza proteinelor musculare și la contracția mușchilor, la reglarea activității neuromusculare, în menținerea echilibrului acido-bazic (intrînd în constituția unor sisteme tampon). Pe de altă parte, potasiul participă la reglarea sintezei unor hormoni: insulină, glucagon, hormon somatotrop. Împreună cu sodiul, potasiul participă la păstrarea echilibrului apei în organism. Tot împreună cu sodiul, potasiul contribuie la normalizarea ritmului cardiac.

### XIII.2.7.4. Necesarul de potasiu

În privința necesarului de potasiu nu există recomandări speciale. Se consideră însă că necesarul minim este de 40 mEq  $K^+$  (160 mg  $K^+$ ) în rația de 24 ore.

Cînd aportul alimentar scade sub acest necesar minim, concentrația potasiului seric se reduce corespunzător și apar manifestări de deficiență.

#### *Deficiența și excesul de potasiu în organism*

Simptomele deficienței de potasiu sînt foarte variate: sete, stare generală de slăbiciune, scăderea funcției neuromusculare, iritabilitate, scăderea reflexelor, pareze, paralizii, uscarea pielii (la bătrîni), acnee (la adolescenți). Deoarece în deficiența de potasiu funcția miocardului este mult influențată, apar tulburări de ritm: tahicardii, extrasistole, fibrilație ventriculară și, în cazuri grave, stop cardiac.

În tulburările renale caracterizate prin incapacitatea rinichiului de a excreta cantități mari de potasiu, se produce hiperkalemie. La rîndul lor, cantitățile mari de potasiu se acumulează în sînge și datorită unui aport exogen excesiv sau cînd au loc eliberări sistematice, masive, de ioni  $K^+$  din celule. Acest ultim fenomen se întîlnește în unele cazuri patologice (acidoză, catabolism proteic intens, distrugerii celulare, hemoliză). Cele mai frecvente manifestări ale excesului de potasiu din organism sînt: crampe musculare, paralizii ale musculaturii căilor respiratorii sau ale extremităților, confuzii, aritmii și — datorită scăderii de tensiune — poate surveni chiar colapsul.



### XIII.2.8. CLORUL

Clorul este un anion esențial aflat în organism; în special, sub formă de clorură de sodiu și clorură de potasiu. În corpul unui adult de 70 kg se găsește cca 85 g cloruri, reprezentând 0,12% din greutatea corpului. Apreciind în mEq concentrația clorului anionic (corespunzător clorurilor) din organism, se consideră că ea este cuprinsă între 1 900 și 2 400 mEq  $\text{Cl}^-$ . Din această cantitate, 1 400—1 750 mEq se află în spațiul extracelular iar restul (500—500 mEq) în cel intracelular. Din clorul intracelular, aproximativ 400 mEq se află în oase și reprezintă fracțiunea de clor numită „neschimbabilă” (vezi esutul osos). În plasmă se află cca 103 mEq  $\text{Cl}^-/\text{L}$ , ceea ce reprezintă 65 mg  $\text{Cl}^-/\text{L}$ . În celule, concentrația clorului este redusă (1—3 mEq/L); în mai în eritrocite și în regiunea cartilaginoasă a oaselor se află o concentrație mai mare (40—50 mEq/L).

#### XIII.2.8.1. Sursele alimentare de clor

Clorul ( $\text{Cl}^-$ ), sub formă de clorură de sodiu sau clorură de potasiu, se găsește în aproape toate alimentele de origine animală sau vegetală care intră în compoziția rației normale.

#### XIII.2.8.2. Metabolismul clorului

Clorul anionic din alimentele ingerate, aflat sub formă de cloruri, este absorbit la nivelul intestinului subțire. După absorbție, sângele îl distribuie în tot organismul dar se concentrează în special, în lichidul cerebrospinal și în secrețiile tractului gastro-intestinal. Tesuturile moi (muscular și nervos) sînt mai sărace în ioni de clor.

Excreția clorului anionic se face în special, prin urină. În cantități mai mici, clorul anionic se excretă prin transpirație și prin fecale.

Cînd absorbția intestinală este tulburată (diaree, vomă) sau în caz de transpirație excesivă, se pot pierde cantități foarte mari de clor din organism. Aceste situații antrenează tulburări grave.

#### XIII.2.8.3. Rolul metabolic

În organism, clorul participă la menținerea echilibrului osmotic extra-/intracelular, la păstrarea echilibrului acidobazic, la producerea acidului clorhidric în stomac, la stimularea funcției depurative a ficatului și la distribuirea unor hormoni.

### XIII.2.8.4. Necesarul de clor

Din cei aproximativ 300 mEq  $\text{Cl}^-$  procurați zilnic de rația alimentară se consideră că organismul reține maximum 100 mEq  $\text{Cl}^-$ /zi. Această cantitate este socotită ca necesară. Apreciat în clorură de sodiu, aportul zilnic adecvat este de 3—8 g.

#### *Deficiența și excesul de clor în organism*

Aporturile insuficiente de cloruri — în special, clorură de sodiu — pot conduce la deficiența marcată de clor, pe lângă deficiența de sodiu (discutată anterior, la prezentarea sodiului). Cantitățile insuficiente de clor atrag și îngreunarea digestiei, fapt care antrenează alte tulburări. De asemenea, în carență de anioni de clor contracția musculară este redusă apreciabil.

Pe de altă parte, așa cum s-a menționat la prezentarea sodiului, aporturile mari de sare (14—28 g clorură de sodiu/zi) sînt considerate excesive și periculoase pentru organism.

### XIII.2.9. OLIGOELEMENTELE

#### XIII.2.9.1. Cobaltul

Cobaltul este un oligoelement care îndeplinește în organism rolul structural de component al vitaminei  $\text{B}_{12}$  și diverse roluri funcționale. Dintre acestea, mai importante sînt cele de activator al unor enzime și de participant eficient la menținerea și buna funcționare a eritrocitelor.

Sursele alimentare cele mai bogate în cobalt sînt : carnea (în special, ficat și rinichi) și laptele. Cantități apreciabile de cobalt se mai găsesc în stridii și unele vegetale marine, însă nu se află în vegetalele comestibile cultivate pe sol.

Cobaltul din hrana ingerată este absorbit parțial prin mucoasa intestinală iar cel rămas neabsorbit se elimină prin fecale. Se pare că absorbția intestinală a cobaltului implică un mecanism de transport odată cu al fierului (vezi, mai departe, la fier). Ca și în cazul fierului, absorbția cobaltului este semnificativ mărită la pacienții cu afecțiuni hepatice, în cazuri de încărcare a organismului cu fier și în hemocromatoza idiopatică.

Cobaltul absorbit este transportat de sînge (cite 0,02—0,61  $\mu\text{mol/L}$  plasmă) și depozitat în diverse organe (ficat, rinichi, splină, pancreas) de unde este apoi mobilizat, la nevoie. Excesul de cobalt (absorbit) este eliminat prin urină.



Necesarul zilnic de cobalt este apreciat la 5—8  $\mu\text{g}$ . Carnea cuprinsă în rația alimentară completă acoperă cu prisosință acest necesar. Este de remarcat că, așa cum au dovedit unele cercetări relativ recente, aportul crescut de cobalt dietar determină mărirea de volum a glandei tiroide iar acest efect se poate corija imediat prin reducerea concentrației cobaltului din hrană.

Scăderea aportului dietar de cobalt sub 5  $\mu\text{g}/\text{zi}$ , un timp mai îndelungat, determină apariția simptomelor de anemie pernicioasă, încetinirea creșterii precum și instalarea unor tulburări nervoase de durată.

### XIII.2.9.2. Cromul

Cromul este un oligoelement aflat în sînge în concentrație de 1—2  $\mu\text{g}$  Cr/ml ser. Deși formează două tipuri de cationi,  $\text{Cr}^{2+}$  și  $\text{Cr}^{3+}$ , numai cationii  $\text{Cr}^{3+}$  prezintă activitate biologică.

Sursele bogate de crom alimentar sînt: drojdia de bere, boabele de cereale, uleiul de germene de porumb, carnea și peștele.

Absorbția cromului din alimente se face la nivelul intestinului în porție mică. De fapt, se reține în organism numai 3% din cromul dietar.

Cromul absorbit este transportat (ca și fierul) de către transferină. Pentru acest transport el compete cu fierul. În organism cromul se depune la nivelul splinei, rinichilor și testiculelor. Depozite mai mici de crom se fac în inimă, pancreas, plămîni și creier. Cromul din aceste depozite scade odată cu înaintarea în vîrstă.

Eliminarea cromului se face mai mult prin urină și mai puțin prin fecale.

În organism, cromul îndeplinește rolul de activator al unor enzime participante la metabolismul glucozei, metabolismul lipoproteinelor plasmatice, sinteza acizilor grași și sinteza colesterolului. Unele studii recente susțin că activitatea insulinei crește în prezența cromului iar alte cercetări consideră că — datorită capacității cromului de a se lega la moleculele de ARN — el este implicat și în sinteza proteică.

Aportul zilnic de crom, prin alimente, este cuprins între 80 și 100  $\mu\text{g}$ . Deși foarte redus, acest aport este necesar căci altfel se instalează tulburări caracteristice deficienței. De exemplu, reducerea marcată a funcției insulinei, ceea ce determină intoleranță pentru glucoză la diabetici și scădere în greutate. De asemenea, deficiența de crom contribuie la declanșarea aterosclerozei căci acest oligoelement inhibă formarea plăcilor ateromatoase, în special, la nivelul aortei.

Expunerea sistematică și timp mai îndelungat la praful de cromat (cu crom hexavalent, mai toxic decît cel trivalent) predispune la cancer pulmonar.

### XIII.2.9.3. Cuprul

Cuprul este un oligoelement aflat în majoritatea organelor. Se consideră că în corpul unui adult se găsesc 100—150 mg cupru. Din această cantitate, în sînge se află 90  $\mu\text{g}/100$  ml.

Sursele alimentare bogate în cupru sînt: carnea (ficat, rinichi), crustaceele, moluscele, legumele verzi frunzoase și legumele uscate precum și fructele; în special, nucile, strugurii și migdalele.

Cuprul din alimentele consumate se absoarbe în proporție de numai 30% la nivelul tractului gastro-intestinal, din cauza insolubilității mari a ionilor  $\text{Cu}^{2+}$ . De fapt, pentru a putea fi absorbiți ionii  $\text{Cu}^{2+}$  sînt complexați de către o substanță cu greutate moleculară mică, neidentificată încă, dar care-i face — în această formă — solubili la pH-ul fluidului intestinal. Apoi, în celulele mucoasei intestinale ionii  $\text{Cu}^{2+}$  se asociază cu metalotioneina — o proteină cu greutate moleculară mică — care are capacitatea de a lega metalele. În acest fel, cuprul traversează peretele intestinal și ajunge în sînge unde se leagă la unii aminoacizi (în special, de histidină) și de serumalbumină. Singele îl duce în tot organismul dar ficatul îl reține foarte repede (în mai puțin de o oră de la absorbție) și îl dirijează pe două căi metabolice:

(1) O primă cale este excreția prin bilă și apoi prin tractul intestinal, de unde nu mai este resorbit, ajungînd astfel să fie eliminat prin fecale. Această cale ajută — aproape exclusiv — la menținerea homeostaziei cuprului în organism. Într-adevăr, s-a constatat că pe măsură ce se ingeră mai mult cupru pe atît se elimină mai mult prin fecale. În schimb, prin urină cuprul este eliminat numai în foarte mică măsură.

(2) Cea de a doua cale metabolică a cuprului în ficat este incorporarea lui — ca parte integrantă — în ceruloplasmină, o glicoproteină biosintetizată exclusiv de ficat.

Ceruloplasmina este o feroxidază cupru-dependentă. Ea conține 95% din totalul cuprului aflat în plasmă. Ceruloplasmina nu trebuie considerată drept proteină de transport a ionilor cuprici ( $\text{Cu}^{2+}$ ), deoarece cuprul pe care-l conține nu este schimbabil cu ioni liberi de cupru sau cu cuprul legat la alte molecule. De fapt, ceruloplasmina conține 6—8 atomi de cupru; jumătate din numărul lor ca ioni cuproși ( $\text{Cu}^+$ ) și jumătate ca ioni cuprici ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Această glicoproteină oxidează ionii feroși ( $\text{Fe}^{2+}$ ) în ioni ferici ( $\text{Fe}^{3+}$ ). În organism se mai găsesc și alte metaloproteine cu cupru: citocromoxidaza, peroxidaza, tirozinaza, monoaminoxidaza, superoxid-dismutaza, lisiloxidaza.

În afară de ficat, cuprul se mai depozitează în rinichi, inimă și creier. Este de remarcă că oasele și mușchii au concentrații mici de cupru dar pentru că ele intră într-o mare proporție în organism, se consideră că cca 60% din cantitatea totală de cupru este distribuită în oase și mușchi.

În afară de faptul că este constituent al multor enzime (menționate anterior), în organism cuprul joacă roluri importante. Astfel, el ia parte la formarea hemoglobinei și a eritrocitelor, înlesnind absorbția fierului. De asemenea, cuprul este necesar pentru constituirea normală și buna funcționare a elastinei și collagenului — două proteine răspîndite în țesuturile de susținere și în fibrele elastice din tot organismul. Pe de altă parte, în metabolismul lipidelor, cuprul participă — prin ionii săi — la sinteza de fosfolipide; în special, a celor din teaca de mielină protectoare din jurul axonilor, la nivelul fibrelor nervoase.

Pentru împlinirea funcțiilor sale în organism, se consideră că necesarul zilnic pentru adult este de 2,5 mg Cu. Pentru copii necesarul se stabilește în funcție de greutatea corporală: 0,05 mg Cu/l kilocorp. În genere, alimentația normală acoperă necesarul deoarece rația completă procură 2,5—5 mg Cu/zi.



Aporturile insuficiente de cupru determină — la copii în special — anemi cauzate de lipsa fierului din hemoglobină, deoarece (aşa cum s-a menţionat) cuprul participă la fixarea fierului în această proteină. Simptomele deficienţei de cupru sînt: astenie, dificultăţi în respiraţie, ulceratii la nivelul pielii.

Excesul de cupru în organism nu se întîlneşte în mod obişnuit. Numai în cazul unei maladii genetice, rare — boala Wilson — cuprul se acumulează în cantităţi mari în ficat, creier, rinichi şi cornee.

Maladia Wilson se caracterizează prin incapacitatea de incorporare a cuprului în apoceruloplasmina — nou sintetizată — pentru a se forma ceruloplasmină. În această boală ficatul nu poate excreta cupru prin bilă şi după înmagazinare excesivă se produc alterări hepatice grave. Din cauză că ceruloplasmina nu mai conţine cupru, nivelul cuprului seric este scăzut dar excreţia urinară creşte foarte mult. Este remarcabil faptul că în asemenea cazuri, absorbţia fierului nu se modifică (nu devine anormală), deşi ceruloplasmina fără cupru nu mai funcţionează ca o veritabilă feroxidază.

#### XIII.2.9.4. Fierul

Fierul este un oligoelement care se află în toate celulele. Organismul unui adult de 70 kg. cuprinde 3—4 g fier din care aproximativ 65% intră în constituţia hemoglobinei. În mioglobina din muşchi se află cea 150 mg Fe iar o cantitate mult mai mică dar constantă (6—8 mg) de fier intră în constituţia coenzimelor şi enzimelor participante la procese de oxidoreducere. Printre acestea, predomină citocromii, catalaza şi peroxidazele. O cantitate de cca 25—30% din fierul total aflat în organism reprezintă „fierul de rezervă” depozitat în ficat, splină şi măduva oaselor. Formele de rezervă sînt proteinele care conţin fier: feritina (solubilă în apă) şi hemosiderina (insolubilă). Tot o proteină asigură şi transportul fierului în organism. Aceasta este transferrina sau siderofilina. Concentraţia plasmatică a fierului unit cu proteine este cuprinsă între 90 şi 140 µg Fe în 100 ml plasmă, în funcţie de sex (la femei, 90—120 µg iar la bărbaţi 120—140 µg).

Sursele alimentare cele mai bogate în fier sînt: carnea (ficat, limbă, inimă), stridiile, gălbenuşul de ou, unele fructe (piersici, caise, pere, prune, struguri, nuci), unele legume (rădăcina şi frunzele de pătrunjel, spanacul, salata verde, mazărea, ridichile de lună, varza, conopida, morcovii).

În hrană fierul se află, mai ales, ca ion trivalent ( $\text{Fe}^{3+}$ ) legat de molecule organice. Alimentele cuprinzînd fierul sub această formă, cînd ajung în stomac — la pH mai mic decît 4 — eliberează ionii  $\text{Fe}^{3+}$  care sînt imediat complexaţi de către molecule organice cu greutate moleculară mică (fructoză, acid ascorbic, acid citric şi aminoacizi). Datorită acestor complecşi,  $\text{Fe}^{3+}$  continuă să rămînă solubil la pH-ul (neutru) al lichidului intestinal. Ulterior, prin reacţii de reducere şi sub control enzimatic,  $\text{Fe}^{3+}$  este redus la  $\text{Fe}^{2+}$  înainte de absorbţie. În această formă el este absorbit în celulele mucozale din duoden şi jejun. În interiorul acestor celule  $\text{Fe}^{2+}$  este reoxidat la  $\text{Fe}^{3+}$  şi legat la o moleculă de transport (cărăuş intracelular) care se saturează cu fier şi apoi îl distribuie — după nevoi — apoferitinei sau apotransferinei.

Apoferitina are greutatea moleculară cca 500 000 și este compusă din 24 subunități identice cu greutatea moleculară 18 000. Apoferitina fixează fierul și trece în feritină. Aceasta este cea mai importantă și disponibilă proteină de depozit a fierului în organism.

Apotransferina este o proteină cu greutatea moleculară 90 000 care poate lega doi atomi (ioni) de fier la o singură moleculă pentru a forma transferina. Aceasta reprezintă adevărata transportoare de fier existentă în plasmă (ca  $\beta$ -globulină).

Este de remarcă că transportul intracelular mucozal al fierului poate fi reglat, în oarecare măsură. De altfel, și eritropoeza — printr-un mecanism necunoscut — promovează transportul rapid al fierului mucozal la apotransferina din plasmă pentru a se genera astfel transferina însăși.

Absorbția fierului se face discontinuu, în funcție de necesitățile organismului. Se apreciază însă că, în genere, se absoarbe numai circa 10% din cantitatea de fier ingerată (în medie, 10—20 mg Fe) iar restul se elimină prin fecale. Numeroși și variați factori interferă cu absorbția fierului: natura sursei alimentare (fierul din proteinele animale este absorbit mai repede decât cel din vegetale); gradul de aciditate gastrică (aciditatea mai ridicată favorizează trecerea în formă  $\text{Fe}^{2+}$ , ușor absorbabilă); prezența vitaminelor C și E (vitamina C fiind reducătoare facilitează trecerea fierului în forma  $\text{Fe}^{2+}$  care se absoarbe mai repede); echilibrul: Ca, P, Fe din alimentul respectiv (excesul de fosfor împiedică absorbția fierului dar în prezență de calciu suficient P se combină cu Ca, formându-se fosfați de calciu iar fierul este eliberat spre a fi absorbit); administrarea de alcalii (bicarbonat), aportul ridicat de celuloză în rație, prezența ceaiului, a cafelei, a oxalaților, fitaților sau fosfaților și motilitatea intestinală crescută. Toți acești ultimi factori împiedică absorbția fierului.

În ceea ce privește fracțiunea de fier absorbit, ea este transportată prin sînge — sub formă de  $\text{Fe}^{3+}$  legat de transferina plasmatică — și dusă la organele de depozit; în primul rînd, măduva oaselor și ficatul. După cum s-a menționat la început, în depozite fierul se află sub formă de feritină — care-l eliberează mai ușor — și hemosiderină care, deși conține mai mult fier decât feritina, îl eliberează mai greu. În schimb, fierul din hemosiderină este cel disponibil pentru formarea hemului și deci, a hemoglobinei.

În scopul utilizării fierului din formele lui de depozit, ionul  $\text{Fe}^{3+}$  trebuie să fie, în prealabil, redus în ion  $\text{Fe}^{2+}$ . Într-adevăr, numeroase date au demonstrat că  $\text{Fe}^{2+}$  este utilizat mult mai rapid și mai eficient.

În organism, fierul îndeplinește roluri structurale și funcționale. Astfel, intrînd în constituția hemului din hemoglobină, el conferă acesteia capacitatea de fixare reversibilă a oxigenului; care este captat la nivelul plămînului și apoi eliberat la nivelul tuturor celorlalte țesuturi. De fapt, numai datorită prezenței fierului din hemoglobină sîngele poate transporta oxigenul de la plămîni la țesuturi, menținîndu-se astfel toate funcțiile fundamentale caracteristice vieții. Fierul intră și în structura mioglobinei — care reprezintă rezervorul de oxigen la nivelul țesutului muscular. După cum s-a mai menționat, fierul intră și în constituția coenzimelor participante la unele reacții de oxido-reducere din lanțul transportorilor de hidrogen și de electroni, precum și în structura anumitor enzime implicate în metabolismul proteic.



Necesarul de fier variază în funcție de vîrstă și sex, conform datelor din tabelul XIII.8. În anumite stări fiziologice (perioade de creștere rapidă, hemoragii, menstruație, sarcină) necesarul de fier al organismului este apreciabil crescut.

Tabelul XIII.8

Necesarul de fier al organismului în raport cu vîrstă și sexul

Vîrstă, ani	Necesarul mg/kg corp	Vîrstă, ani	Necesarul mg/kg corp
0—1	1	adulți (bărbați)	10
1—9	8—12	adulți (femei)	15—18
9—18	15		

Aportul insuficient de fier determină anemia hipocromă, în care porția de hemoglobină din eritrocite este mult redusă. În paralel, se reduce și capacitatea de transport a oxigenului prin sînge, ceea ce atrage instalarea dificultăților respiratorii. Anemia produsă de lipsa fierului survine și cînd aportul alimentar este suficient dar absorbția lui devine deficitară din diverse cauze. Diareea, aclorhidria, anumite reacții gastrointestinale contribuie și ele la tulburarea absorbției de fier alimentar. De asemeni, deficiența de fier în organism apare și datorită pierderilor mari de sînge, în cazuri de hemoragii.

Situațiile caracterizate prin acumulări mari de fier în organism sînt multiple și foarte variate. Cele mai frecvente au loc prin: aport dietar crescut, mărirea absorbției intestinale, accentuarea lizei de celule roșii, transfuzii sau administrare orală, prelungită, de medicamente cu fier. Pe de altă parte, în cazurile unor erori genetice ajung să se acumuleze cantități mari de fier în ficat, pancreas, splină, piele și articulații. De cele mai multe ori, depozitele excesive de fier în ficat conduc la insuficiență hepatică și la ciroză.

### XIII.2.9.5. Iodul

Iodul se află în organism într-o concentrație foarte mică; 25 mg. Cca 30% din această cantitate totală se află în glanda tiroidă (1 mg I/100 g țesut). Cantități mai mici se găsesc în rinichi (0,4 mg I/100 g țesut) și în ficat (0,12 mg I/100 g țesut).

Cele mai bogate surse alimentare cuprinzînd iod sînt plantele și animalele marine, apa de băut și ciupercile cultivate pe soluri care conțin iod.

Iodul din alimentele consumate este absorbit cu ușurință la nivelul intestinului subțire și apoi este transportat, pe cale sangvină, în tot organismul, concentrîndu-se, mai ales, în organele menționate. La nivelul glandei tiroide, iodul absorbit sub formă de ion este oxidat în iod atomic și apoi utilizat pentru sinteza triiodtironinei și a tiroxinei, principalii hormoni tiroidieni în constituția cărora intră acest oligoelement.

Excreția iodului se face prin urină.

Cel mai important rol al iodului în organism este de a ajuta la dezvoltarea și buna funcționare a glandei tiroide. Prin hormonii tiroidieni activi, în consti-

tuția cărora se află, iodul stimulează metabolismul și producerea de energie. Iodul previne depozitarea colesterolului în artere și îi înlesnește metabolismul. De asemenea, iodul stimulează creșterea și intervine în procesul de transformare a carotenilor în vitamina A, prin intermediul hormonilor tiroidieni.

Necesarul de iod al organismului adult este considerat de 100 mg I/zi pentru femei și 130 mg I/zi pentru bărbați. În condiții fiziologice speciale (sarcină, alăptare) necesarul zilnic de iod, la femei, este crescut (125—150 mg).

Necesarul de iod trebuie să fie asigurat zilnic de apa de băut și rația alimentară, pentru a nu se crea condiții favorizante deficienței în acest oligoelement. Deficiența de iod reduce apreciabil producerea de hormoni tiroidieni, glanda tiroidă își mărește volumul (eventual, apare gușa), ritmul metabolic se încetinește, funcțiile mentale scad, apare obezitatea și tulburări nervoase specifice.

Deficiența de iod determină și cretinismul, boală congenitală caracterizată prin întârzierea dezvoltării fizice și mentale la copii născuți din mame care nu au primit aporturi suficiente de iod în adolescență sau în timpul sarcinii.

Când aporturile de iod în rație sînt mari, crește și eliminările astfel încît nu se produc fenomene de toxicitate. Acestea apar însă prin administrarea sistematică și în cantitate mare a iodului, ca medicament.

#### XIII.2.9.6. Manganul

Manganul este un oligoelement aflat în organismul adultului în cantitate de 10—20 mg, fiind concentrat — mai ales — în ficat, pancreas, rinichi, oase și glanda hipofiză.

Sursele alimentare bogate în mangan sînt, în special, vegetalele (legumele verzi, boabele de cereale, nucile). În concentrații mai mici, manganul se află în carne, pește, produse lactate, ceai și chiar în apa de băut.

Din alimentele ingerate manganul este absorbit la nivelul intestinului subțire, printr-un mecanism similar celui întîlnit la fier. Absorbția manganului crește în cazul deficienței de fier și scade cînd rația alimentară cuprinde cantități apreciabile de calciu sau fosfor. După absorbție, manganul, sub formă de ioni  $Mn^{2+}$ , trece în singele portal și se depozitează în ficat. Tot singele repartizează ionii  $Mn^{2+}$  și celorlalte organe de depozit menționate.

Excreția manganului se face, în special, prin fecale.

În organism, manganul participă la sinteza glucidelor, lipidelor și proteinelor, în calitate de activator al multor enzime implicate în aceste procese. Dintre enzimele mai importante activate de ionii  $Mn^{2+}$  fac parte: glicozil-transferazele (responsabile de biosinteza oligozaharidelor, glicoproteinelor și proteoglicanilor), diverse hidrolaze, kinazele, decarboxilazele și superoxid-dismutaza. Tot în calitate de activator enzimatic, manganul participă la utilizarea biotinei, tiaminei, vitaminei C și colinei în organism. De asemenea, manganul este un element mineral util pentru formarea ureei, pentru producerea laptelui și a hormonilor sexuali. Pe de altă parte, manganul stimulează transmisia impulsurilor neuromusculare iar cercetări mai recente au condus la concluzia că ionii  $Mn^{2+}$  au rol pozitiv în tratamentul aterosclerozei.

Necesarul zilnic de mangan al adultului este cuprins între 3 și 9 mg. Rația zilnică și completă procură, în medie, 4 mg mangan. Însă cînd rația



alimentară conține mult calciu și fosfor (fosfați) necesarul de mangan este crescut.

Deficiența de mangan reduce sau chiar suprimă activitatea enzimelor pe care le activează când se află în concentrații normale și, prin acest efect, antrenează tulburări în toate metabolismele la care participă enzimele respective. Datorită acestui fapt, deficiența de mangan conduce la ataxie, convulsii și paralizii. La copii deficiența de mangan poate provoca întârzierea creșterii, orbire și surditate.

La lucrătorii care manipulează pulberi de mangan, deci absorb metalul în tractul respirator, se produc ușor intoxicații cu mangan. Acestea se manifestă prin stări de slăbiciune, dificultăți motorii și tulburări psihice. De asemenea, concentrațiile mari de mangan din organism, determinate de aporturi alimentare cuprinzând elementul în exces, au ca prim rezultat reducerea depozitelor de fier, ceea ce antrenează tulburări grave.

### XIII.2.9.7. Molibdenul

Deși se află în cantități foarte mici în organism, molibdenul îndeplinește roluri biochimice importante. El intră în constituția metaloenzimelor : xantin-oxidaza, aldehidoxidaza și sulfitoxidaza.

Sursele alimentare cele mai bogate în molibden sînt : carnea (în special, rinichii), unele cereale și legumele cu frunzele colorate în verde închis. Conținutul în molibden al vegetalelor din hrană depinde de concentrația acestui element în solul pe care ele au fost cultivate.

Absorbția molibdenului din alimentele ingerate se face la nivelul intestinului subțire ; formele hexavalente, solubile în apă, sînt cele mai ușor absorbite.

Excreția molibdenului are loc, cu precădere, prin urină.

Importanța metabolică a molibdenului este relevată de rolurile enzimelor care-l cuprind în catabolismul lipidelor (aldehidoxidaza) și în catabolismul acizilor nucleici (xantinoxidaza). De asemenea, xantinoxidaza servește și la mobilizarea fierului din rezervele hepatice. Pe de altă parte, molibdenul este considerat ca indispensabil în prevenirea formării cariilor dentare (la nivelul smalțului).

Nu se cunosc manifestări ale deficienței molibdenului la om căci rația alimentară îl procură în cantități suficiente pentru acoperirea nevoilor. În schimb, se cunosc simptomele încărcării organismului cu molibden : diaree, anemie și scăderea ritmului de creștere la copii.

Studii recente tind să susțină că excesul de molibden conduce la deficiența de cupru în organism. Cum însă cuprul este necesar fixării fierului în hem, se înțelege de ce excesul de molibden poate determina anemie (cel puțin a tipului de anemie datorată lipsei de fier).

### XIII.2.9.8. Seleniul

Seleniul este un oligoelement care se găsește în organism în cantitate de 13—20 mg la adult.

Seleniul se află în special, în vegetale. Sursele alimentare cele mai bogate în acest oligoelement sînt : boabele de cereale (germenele și tărițele) și legu-

mele (mai ales, roșiile și ceapa). Ca și în cazul molibdenului, conținutul în seleniu al vegetalelor depinde direct de cel al solului pe care ele au fost cultivate.

Seleniul din alimentele ingerate este absorbit la nivelul intestinului subțire și apoi repartizat de sînge în mod preferențial; în special, ficatul și rinichii sînt organele cele mai bogate în seleniu. De fapt, ficatul și rinichii conțin de 4—5 ori mai mult seleniu decît mușchii sau alte țesuturi.

Din organism, seleniul este excretat prin urină, fecale, căile respiratorii și piele. Se consideră că excreția zilnică, totală, de seleniu este cuprinsă între 100 și 150  $\mu\text{g}$ . Această cantitate este perfect echivalentă cu aportul zilnic al seleniului alimentar.

În organism, seleniul joacă rol de antioxidant natural. În această calitate, el contribuie substanțial la întîrzierea oxidării acizilor grași polinesaturați. Seleniul intră în constituția glutathionperoxidazei, enzimă care catalizează oxidarea glutathionului. Aceasta, datorită constituției sale chimice, protejează hemoglobina de oxidări excesive. De asemenea, seleniul asociat cu vitamina E intervine în unele procese metabolice, cu același rol de antioxidant intracelular. De fapt, seleniului i se atribuie capacitatea de economisire a vitaminei E în funcția antioxidantă. Tot asociat cu vitamina E, seleniul participă și la procesele de promovare a creșterii.

Necesarul de seleniu nu este precis cunoscut dar se apreciază că ar fi foarte mic. Într-adevăr, cantități de ordinul 5—10 ppm sînt socotite toxice. Deși mecanismul toxicității nu este perfect cunoscut (înlocuirea probabilă a sulfului din constituția unor compuși biologici importanți sau inhibarea anumitor enzime), intoxicațiile cu seleniu pot surveni în diverse ocazii. Cele mai frecvente intoxicații cu seleniu sînt cele profesionale, întîlnite la muncitorii din industria electronică, a sticlei și coloranților. Simptomul imediat de recunoaștere este halena cu miros de usturoi determinată de exalarea dimetilselenidului de către persoanele intoxicate cu seleniu.

Se cunosc și simptomele deficienței de seleniu. Ele sînt întîlnite la indivizii care nu primesc prin rația alimentară acele cantități infime dar strict necesare de seleniu. Efectul imediat al deficienței de seleniu se recunoaște prin modificări produse la nivelul inimii. Aceasta se congestionează și își mărește volumul. De asemenea, deficiența de seleniu poate conduce la fenomene de îmbătrînire prematură. Ea apare mai evident la nivelul tegumentelor deoarece seleniul este unul din elementele minerale care contribuie la păstrarea elasticității tisulare.

### XIII.2.9.9. Zincul

După fier, zincul este cel mai abundent oligoelement din organism. În corpul adultului se găsește, în total, cca 1,8 g zinc. Este de remarcat că în celule zincul nu se află liber ci asociat cu proteine, în anumite proporții: 82—117  $\mu\text{g}$  Zn/1 g proteină.

Sursele alimentare cele mai bogate în zinc sînt: carnea (în special, ficatul), ouăle, laptele, boabele de cereale, sămînța de dovleac și drojdia de bere.

După ingerarea alimentelor care-l conțin, zincul este absorbit în regiunea superioară a intestinului subțire. Această absorbție a zincului este facilitată de un factor cu moleculă mică, acidul picolinic, secretat de pancreas care complexează ionii  $\text{Zn}^{2+}$  și îi trece în celulele mucozale. La acest nivel, zincul este



reținut de proteine care leagă ionii respectivi, ca și în cazul absorbției fierului. Ulterior, zincul este transferat direct pe albumina plasmatică. Când în lumenul intestinal se află și cupru, acesta competiționează cu zincul, în procesul de absorbție, pentru ocuparea aceluiași locuri de legătură pe molecula de albumină plasmatică. De asemenea, absorbția intestinală a zincului este stinjenită de prezența, în aceeași rație alimentară, a unor cantități mai mari de calciu sau de acid fitic.

Transportat de albumina plasmatică, zincul absorbit este dus în tot organismul însă la nivelul anumitor țesuturi sau organe oligoelementul este depus în cantitate mai mare. Principalele organe de depozit ale zincului sînt : ficatul, pancreasul, rinichii, oasele și mușchii care se contractă voluntar. Depozite mai reduse se formează în hipofiză, tiroidă, ochi, prostată, păr și unghii.

Excreția zincului se face, în cea mai mare măsură, prin fecale și în cantitate mai mică prin urină. S-a dovedit că se poate elimina zincul, în cantități apreciabile, și prin transpirație, în special, la indivizii care trăiesc în regiunile tropicale.

În organism, zincul îndeplinește roluri structurale și funcționale datorită faptului că intră în constituția mai multor metaloenzime implicate în toate categoriile de metabolisme. Printre metaloenzimele cu zinc, se numără : anhidraza carbonică, lactatdehidrogenaza, glutamatdehidrogenaza, fosfataza alcalină, timidinkinaza. În afară de această participare prin enzimele în constituția cărora intră, zincul este necesar și la reglarea metabolică prin insulină, hormon hipoglicemiant. Pe de altă parte, zincul favorizează absorbția normală și acțiunea vitaminelor ; în special, a celor din complexul B și a vitaminei A.

Datorită faptului că este constituent al timidinkinazei și al altor enzime de interes metabolic, zincul este necesar pentru buna desfășurare a biosintezei acizilor nucleici și, prin ei, a biosintezei proteinelor. Cum însă aceste două categorii de biosinteză sînt implicate direct în creștere, se poate afirma că zincul este un oligoelement esențial pentru creștere și pentru dezvoltarea normală a organismului.

Necesarul zilnic de zinc, la omul adult, este de 15 mg. În sarcină necesarul crește cu încă 15 mg Zn/zi, iar în perioada de alăptare cu încă 25 mg Zn/zi.

Deficiența de zinc poate surveni în urma unor cauze multiple și variate : rația alimentară dezechilibrată sau conținînd zinc în cantitate mai mică decît cea necesară, absorbție intestinală stinjenită de prezența excesivă a calciului, cuprului, fierului, cadmiului sau acidului fitic, consum exagerat de alcool (deoarece alcoolul favorizează eliminarea zincului prin urină). Carența de zinc determină alterări ale gustului și mirosului, pierderea apetitului, întîrzieri în vindecarea rănilor, leziuni cutanate, tulburări ale acuității vizuale (în special, la copii), încetinirea creșterii (nanism hipoglandular) întîrzierea maturizării sexuale (uneori chiar sterilitate). Deficiența de zinc poate conduce și la modificări anormale în mărimea și structura prostatei. În cancerul de prostată concentrația sa în zinc scade mult. Deficiența de zinc, alături de cea de cupru, se poate instala și în arteroscleroză. De asemenea, în anumite boli hepatice, ciroză alcoolică, ulcere sau în perioada de sarcină, concentrația zincului din plasmă scade foarte mult. S-a constatat că la bolnavii cu deficiență de zinc este crescută, în mod apreciabil, activitatea ribonucleazei serice iar activitatea anhidrazei carbonice eritrocitare este foarte mult scăzută.

În ceea ce privește excesul de zinc în organism, s-a observat că el inhibă utilizarea cuprului în metabolismul fierului.





# Index alfabetic

## A

Acetil—CoA 106, 134, 362  
 Acetilcolină 508  
 Acetoacetat 366, 532  
 Acetona 365  
 Acid acetilmuramic 54  
 — N-acetilneuraminic 257, 263  
 — acetoacetic 360, 430  
 — adenilic 470  
 — aminoacetic 15  
 — amino-amido-glutaric 17  
 — succinic 17  
 — p-aminobenzoic 18  
 — aminobutiric 18  
 — aminoglutaric 17  
 — aminoguanidinovalerianic 17  
 — aminohidroxiubutiric 16, 18  
 — aminohidroxiipropionic 16  
 — aminoindolilpropionic 16  
 — aminoimidazolilpropionic 16  
 — aminoizocaproic 15  
 — aminoizovalerianic 15  
 — aminolevulinic 18, 34, 47  
 — aminometiltiobutiric 17, 18  
 — aminometilvalerianic 15  
 — aminopropionic 15, 18  
 — aminosuccinic 17  
 — aminoliopropionic 16  
 — aminoamidinovalerianic 18  
 — arahidonic 334, 332, 369, 510  
 — argininsuccinic 423  
 — ascorbic 115  
 — aspartic 17, 22, 420, 428, 432, 433  
 — behenic 334  
 — biliari 350, 351, 438  
 — butanoic 332  
 — butiric 334  
 — caprilic 334  
 — capric 334  
 — caproic 332  
 — carbonic 490

Acid carbamilaspartic 486  
 — carbonic 578  
 — chenodezoxicolic 349  
 — cisteic 26  
 — citidilic 426  
 — citric 426  
 — colanic 351  
 — colic 351  
 — decanoic 332  
 — dezoxicolic 349, 388  
 — diaminocaproic 17  
 — diaminovalerianic 18  
 — dihidroorotic 486  
 — decosanoic 338, 332  
 — dodecanoic 332  
 — dehidroascorbic 115  
 — folic 112  
 — fosfatidic 338, 375  
 — fosfoenolpiruric 228  
 — fumaric 52, 226, 426, 428, 434  
 — glucronic 297, 300, 330, 461  
 — glutamic 17, 22, 112, 220, 420, 414, 417, 425, 426, 428, 434  
 — guanidinacetic 470  
 — guanilic 470  
 — hexadecanoic 332  
 — hexanoic 332  
 — hialuronic 326, 327, 329  
 — hidroxiilignoceric 332  
 — hidroxitetracosenoic 332  
 — hipuric 441  
 — icosanoic 332  
 — icosatetraenoic 332  
 — inozinic 470  
 — izocitric 426  
 — lactic 52  
 — lauric 334  
 — lignoceric 334  
 — linoleic 334  
 — litocolic 388, 386  
 — malic 26, 365, 428

Acid maleic 52  
 — mevalonic 384  
 — miristic 334  
 — nalidixic 189  
 — nervonic 334  
 — neuraminic 257  
 — nicotinic  
 — octadecenoic 338  
 — octadecatrenoic 332  
 — octadecanoic 332  
 — octanoic 332  
 — oleic 334  
 — orotic 470, 489, 486  
 — orotidilic 470, 486  
 — oxaloacetic 106, 107, 426, 427, 433  
 — palmitic 220, 334, 364, 355  
 — palmitoleic 334  
 — pantolenic 102  
 — pirolidincarboxilic 16  
 — piruric 52, 92, 106, 231, 232, 365, 423, 428, 434, 433, 446  
 — retinoic 122  
 — serinfosforic 26  
 — sialic 320, 378  
 — stearic 334  
 — succinic 52, 426  
 — taurocolic 350  
 — tetracosanoic 332  
 — tetradecanoic 332  
 — tetrahidrofolic 113, 114  
 — tetraiodotioracetic 413, 513, 516  
 — timidilic 470  
 — treoninfosforic 26  
 — uric 470, 484, 486, 488, 489  
 — uridilic 470  
 — uronic 263  
 — xantilic 470  
 Acil-CoA 89  
 Acilgliceroli 331, 335  
 Acizi grași 334, 335, 364, 376, 382, 389, 404, 440, 577  
 — nucleici 132, 139  
 Acromotrichia 103  
 Actina 14, 520  
 Actinomicina D 183  
 Adebukatkinaza 83  
 Adenina 134, 215, 470, 485  
 Adenohipofiză 470, 497, 508, 550  
 Adenozina 135, 473, 484, 485  
 ADN 19, 53, 132, 147, 155, 167, 173, 196, 200, 214, 504  
 ADP 231, 473  
 Adrenalina 420, 493, 496, 533, 534  
 Agmatina 420  
 Alanină 15, 18, 24, 22, 52, 207, 287, 423, 432, 428, 496  
 Alaninracemaza 58  
 Alantoină 486  
 Albinismul 434  
 Alcaptonuria 434  
 Alcool 87  
 — dehidrogenaza 57, 63

Aldohexoză 252  
 Aldolaza 42  
 Aldosterona 497, 536, 539, 540, 541  
 Aldotrioza 249  
 Alizina 32  
 Altroză 249  
 Aloză 249  
 Amfibieni 556  
 Amidon 264, 266  
 Amilaza 14, 57  
 Amilopectina 264, 265  
 Amiloza 264, 265  
 Amine biogene 419  
 Aminoacizi 14, 20, 75, 412, 438, 439, 529  
 Aminopeptidaza 413  
 Aminotransferaza 83, 101  
 Aminozaaharuri 255  
 Amoniac 423, 425, 575  
 AMP 227, 372, 476  
 Androgenii 545  
 Androstan 349  
 Androstendiol 542  
 Androstendiona 536, 540, 541, 539  
 Androsteronă 546  
 Aneurină 90  
 Angiotensina 41, 508, 540, 541, 541  
 Anhidraza carbonică 57, 71  
 Antigen 505  
 Apa 566, 570, 574  
 Apoenzimă 450  
 Apolipoproteină 393  
 Arabinani 264  
 Arabinoză 230, 264, 320  
 Arginaza 57  
 Arginina 17, 22, 28, 428, 434  
 ARN 132, 163, 161, 162, 165, 170, 323  
 ASAT 83  
 Asparaginaza 421, 426  
 Asparat 71, 207, 287, 470, 487, 488  
 ATP 100, 151, 227, 229, 231, 473  
 ATP-aza 57  
 Axeroftal 120

## B

Baze pirimidinice 490  
 — Schif 102  
 Bicarbonat 582  
 Bilirubina 461, 463, 464  
 Biliverdină 460, 461  
 Biocatalizatori 74  
 Biotina 104, 105  
 Biotinenzimă 107  
 Boala Farber 380  
 Boala Gauher 380  
 — Giercke 316  
 — Gilbert 463  
 — Krabbe 380  
 — Nhiemann-Pick 379  
 — Tay-Sachs 380  
 Borax 575  
 Bradikinina 41  
 Bronhiolă 538



## C

Cadaverina 31, 424  
 Calcitonina 497, 521  
 Calciu 510, 518, 585  
 Calmodulina 511  
 Carbamil 495  
 — fosfat 234  
 Carboxibiotina 107  
 Carboxipeptidaza 57, 419  
 Carnozină 41  
 Caroten 119, 127  
 Carotenoizi 347  
 Catalaza 57, 71, 245  
 Catecolamine 372, 502, 534, 536  
 Cazeina 415  
 CDP 470  
 Cefaline 340  
 Celobioza 269  
 Celule pancreatice 506  
 Celuloza 267  
 Ceramid 379  
 Cerebrozide 344  
 Ceride 337  
 Ceruloplasmină 42, 600  
 Cerurile 332, 345  
 Cetoheoxoză 252  
 Citogeneza 360, 361  
 Chilomicrohi 390, 392, 394  
 Chimotripsina 28, 53, 60, 71, 415  
 Chimotripsinogen 415  
 Chimoza 415  
 Ciancobalamina 107  
 Ciclohexan 346  
 Cicul acizilor tricarboxilici 425  
 — Cori 303  
 — Krebs 270, 282, 286  
 — urogenetic 422  
 Cisteamină 26, 420  
 Cisteină 16, 22, 420, 428, 438  
 Cistină 26  
 Cistinoza 434  
 Cistinuria 434  
 Citidină 136, 470  
 Citocromi 14, 45, 51, 57, 84, 117, 234  
 Citocromoxidaza 57  
 Citoplasma 241, 284  
 Citozină 134, 211, 470, 490  
 Citozol 323, 357, 426, 450  
 Citratsintetaza 84  
 Citrulina 18, 20, 424, 425, 432  
 Clor 599  
 CMP 46  
 Cobalamina 111  
 Cobalt 600  
 Cocarboxilaza 91  
 Cod genetic 180, 181  
 Codoni 186  
 Coenzime 56, 88, 102, 235  
 Colagen 14, 188  
 Colamină 419  
 Colan 350  
 Colecalciferol 123, 126, 520

Colecistokinină 497, 529, 533, 565  
 Colestan 350  
 Colestandienol 390  
 Colesterol 340, 350, 381, 382, 386, 388, 395, 403  
 Colina 376, 377  
 Complexul B 95  
 — Golgi 328  
 Condroitin sulfat 327, 334  
 Coproporfiria 460  
 Coprostanol 387  
 Coprostanonă 387  
 Corp citros 573  
 Corpi cetonici 377, 583  
 Cortex 508  
 Corticosteronă 544  
 Corticotropină 497, 531, 539, 541, 543, 554  
 Cortizol 497, 534, 542, 545  
 Creatina 440  
 Creatinină 440  
 Creier 381, 496  
 Cromoproteine 47  
 Cromul 601  
 Cuprul 601

## D

Deoxiadenozină 142  
 Deoxiadenozilcobalamina 111  
 Deoxicitidină 142  
 Deoxiguanozină 142  
 Desoxiriboza 133  
 Deoxizaharuri 257  
 DHAP 240  
 Dihidroxiacetona 250  
 Diacilglicerol 506  
 Dihidrotosteron 542  
 Dihidroxiuridină 164  
 Dipeptidaze 415  
 Dipeptide 413  
 Dislipidemii 400  
 Dismutază 460  
 Dolicoli 328, 351  
 Dopa 535  
 Dopamina 534, 535

## E

Elastază 415  
 Elastina 415, 600  
 Elemente aditionale 58  
 — minerale 58  
 Encefalină 562  
 Endonuclează 21  
 Endorfine 558, 559  
 Enzime 48  
 Epifiza 496, 561  
 Epinefrina 316, 531, 537  
 Ergocalciferol 123  
 Ergosterol 123, 129  
 Eritromicină 189  
 Eritropoietina 563  
 Eritroza 250

Eritruloză 250  
Estradiol 497, 500, 546, 548  
Estran 349  
Estriol 546  
Estronă 548, 497  
Etanolamină 25  
Etiocolanolona 546  
Exoni 175

## F

Factorul de creștere 500, 511, 564  
FAD 56, 95, 287  
Farnesil 385  
Farnesol 344  
Fenilacetilglutamina 440  
Fenilalanina 15, 22, 286, 415  
Fenilcetonuria 434  
Fenobarbital 466  
Feritina 14  
Fibrinogen 14, 45  
Fibroblaști 508  
Ficat 502, 570, 374  
Fier 603  
Flarinmononucleotid 94  
Flaroproteine 95  
Fosfataza alcalină 42  
Fosfatid 331  
Fosfatidil-colina 342, 344  
— gliceroli 342  
— etanolamine 340  
— serina 340  
Fosfați 580  
Fosfagliceride 331, 333, 335  
Fosfohidrolaza 57  
Fosfatidilinozitol 341  
Fosfolipaza 83  
Fosfolipide 382  
Fosfoproteine 46  
Fosforul 589  
Fosfotransferaza 57  
Fosfoliză 525  
Fructofuranoză 261  
Fructoza 246, 253, 258, 260, 268, 320  
Fucoza 257  
Fumarat 242  
Fumaraza 84  
Furan 252

## G

GABA 18  
Galactocerebrozid 342  
Galactocerebrozidoza 380  
Galactopiranoza 255  
Galactoză 246, 270, 317, 378, 380  
Galactozamină 269, 326  
Galactozani 264  
Ganglioizide 342  
Gastrina 529, 533  
Ganglioizidoza 379, 380

Gastricsină, 415, 494, 497, 526, 530  
Gene 191  
Geranil 383  
Geraniol 346  
Giraza 157  
Glanda pineală 420, 558  
— pituitară 550  
— suprarenală 530  
— tirodă 510  
Glicani 263  
Gliceraldehidă 247, 250  
Gliceride 333, 335  
Glicerină 580  
Glicerofosfolipide 337, 376  
Glicerol 369, 371, 372  
Glicilglicină 220  
Glicină 21, 228, 426, 434, 468  
Glicocol 15, 22, 350, 370, 386, 438  
Glicogen 266, 272, 307, 309, 313, 315, 322, 443  
Glicogen-fosforilază 42  
Glicogen-sintetază 14  
Glicogenoliza 310, 312, 535  
Glicogenoza 316  
Glicoforine 326  
Glicolipide 341  
Glicoliza 271, 227, 308, 576  
Glicoproteine 46, 320, 322, 326  
Glicosfingolipide 343  
Glicozilare 323  
Glucagon 372, 497, 502, 521, 529, 533  
Glucide 375, 246, 266, 445  
Glucocerebrozid 342  
Glucocorticoizi 442  
Gluconeogeneză 300, 304, 314  
Glucopiranoză 254  
Glucozamină 263, 320  
Glucosa 246, 253, 258, 269, 290, 313, 443, 516, 527  
Glutamat 207, 287, 470, 485  
— dehidrogenază 71, 84  
— sintetaza 42  
Glutamina 17, 22, 28, 226, 428, 434, 470, 488, 490  
Glutation 41, 250, 251, 439  
G.M.P. 476  
G.N.P. 300  
Gonadotropina 497, 502, 551, 556  
Gonan 347  
Grăsimi exogene 373  
— neutre 335  
GTP 151, 467  
Guanină 134, 210, 470, 481, 483  
Guanozină 135, 473, 470, 481  
Guta 483

## H

Helicoza 151, 160  
Hemoglobina 14, 42, 45, 51, 117, 581  
Hemoproteine 444



Hemul 446, 449, 450, 451, 456  
 Heparan sulfat 337  
 Heparină 330, 327, 331  
 Hepatocite 83  
 Hepatocit 461  
 Hepatosplenomegalie 400  
 Heptoglobină 580  
 Heteroglicani 270  
 Hidrolaze 86, 87  
 Hidroxifenilalanina 16  
 Hidroxilizina 14, 120, 182, 320  
 Hidroxiperoxid 336  
 Hidroxiprolina 24, 120, 188, 320  
 Histona 14, 40  
 Hiperbilirabinemii 463  
 Hipokalemie 541  
 Hiperkalemie 541  
 Hiperuricemie 483  
 Hiperlipoproteinemii 400  
 Hipofiza 550  
 Hipotalamus 496, 548  
 Hipoxantină 208, 467, 483, 484  
 Histamina 24, 417, 418  
 Histidină 16, 22, 419, 420, 430, 432, 433  
 Histidinemia 434  
 Histone 14, 51, 147  
 Homocisteina 18, 116, 438, 480  
 Hemocisteinmetiltransferaza 110  
 Homoglicani 264  
 Homoserina 18, 20, 438  
 Hormoni 14, 80, 87, 349, 495  
 — adenohipofizari 551  
 — androgeni 347  
 — de creștere 14, 551  
 — corticosteroizi 347  
 — corticosuprarenalieni 538  
 — corticosteroizi 538  
 — estrogeni 347  
 — gestrageni 347  
 — gastrointestinali 532  
 — hidrosolubili 502  
 — hipofizari 550, 553  
 — hipotalamici 550, 553  
 — lactogeni 493, 553  
 — liposolubili 502  
 — luteinici 556  
 — medulosuprarenalieni 533  
 — neurohipofizari 557  
 — ovarieni 548  
 — paratiroidieni 519  
 Hormoni pancreatici 524  
 — peptidici 505  
 — steroidici 500, 505  
 — sexuali 500, 545  
 — tiroidieni 505, 515, 512  
**I**  
 ICDH 84  
 Icosanoizi 404, 409, 447  
 Icter hemolitic 464  
 — idiopatic 464  
 Idiotia amaurotică 378

IMP 467, 480  
 Imunoglobine 14, 326  
 Inima 496, 570  
 Inozină 164, 470, 481, 480  
 Inozitol fosfatide 341  
 Insulele Langerhans 525, 532  
 Insulina 14, 23, 30, 45, 321, 372, 496, 497, 524, 525  
 Intestin 496, 516, 538, 570, 602  
 Iodul 605  
 Ionizarea apei 574  
 Izocitratdehidrogenaza 84  
 Izoenzime 58  
 Izoleucina 15, 22, 76, 429  
 Izomeraze 86, 87  
 Izopren 377

## K

Kanamicina 180  
 Keratan sulfat 327  
 Kinaza 300, 316

## L

Labferment 415  
 Lactat dehidrogenaza 14, 42  
 — hidrogenază 14  
 Lactoflavina 93  
 Lactoză 263, 266  
 Lanosterol 386  
 Lapte 570, 597  
 LDH 52  
 Lecitină 338, 353, 352, 399  
 Leucina 15, 22, 286, 415, 429  
 Leucodistofie 381  
 Leucotriene 404  
 Liaze 86, 87  
 Lichid cefalorahidian 567  
 Ligandină 460  
 Ligaze 86, 87  
 Limfa 570  
 Lipaza 331  
 — intestinală 51  
 — pancreatică 51  
 Lipide 333, 352, 440, 577  
 — nesaponifiabile 343  
 — plasmatică 387  
 Lipoliză 535  
 Lipoproteina 46, 382, 390, 395, 397, 399  
 Lipoxigenaza 408, 409  
 Lizina 22, 26, 51, 117, 420  
 Lizolecitină 353  
 Lizozim 40, 45, 59, 60, 62  
 Lixoză 250

## M

Maladia Hers 317  
 Maladia Wilson 600  
 Maltoză 262, 266

Magneziu 591  
 Mamotropină 553  
 Manganul 606  
 Manani 264  
 Manitol 258  
 Manzoa 250, 264, 320  
 MAO 83  
 Mastocite 508  
 Medulara 496  
 Medulosuprarenala 493, 531  
 Melatonina 421, 493, 560, 559  
 Mercaptide 264  
 Mere 597  
 Metabolism 563  
 Metaloenzime 56  
 Metalofloroproteine 95  
 Metaloproteine 47  
 Metilcitudină 164  
 Metanefrină 534  
 Metilcrotionil-CoA 106  
 Metilcobalamina 106  
 Metilmalonil-CoA 107  
 Metilxantina 370  
 Methemoglobină 117  
 Metionina 17, 22, 187, 415  
 Metionil 106  
 Miocard 538  
 Mioglobine 28, 38, 45  
 Miohemeritrină 39  
 Miozina 14, 42, 45, 520  
 Mitochondrii 89, 241, 284, 364, 365  
 Mitomicina 189  
 Molibden 607  
 Monoaminoxidaza 83  
 Monozaharide 251, 247  
 Motilina 533  
 Mutații 206  
 Mușchi 508, 570

## N

NAD 56, 151  
 NADH 235  
 NAD-dehidrogenaza 84  
 NADP 56, 83, 100  
 NANA 260  
 Neomicina 189  
 Neurohipofiza 496, 551, 554  
 Neuropeptide 495, 562  
 Niacina 95, 96  
 Noradrenalină 424, 497, 525, 536  
 Norepinefrina 531  
 Normetanefrină 536  
 Nucleoproteine 47  
 Nucleotide 137, 470, 490  
 — pirimidinice 466, 485  
 — purinice 466  
 Nucleozid 83, 136, 470, 490  
 Nucleu 500

## O

Obezitate 400  
 Ociticină 47  
 Oligoelemente 584, 600  
 Oligonucleotid 206  
 Oligozaharid 261, 327, 324  
 Oligozide 240  
 OMP 470, 488  
 Operon 192  
 Opsina 124  
 Ornitina 18, 20, 413, 420, 424, 425  
 Orotat 490  
 Orotidină 470  
 Ouă 597  
 Ovalbumina 28  
 Ovar 496  
 Oxaloacetat 241, 290  
 Oxido-reductaze 83  
 Oxitocină 497, 557  
 Oxide 246

## P

Pancreas 496, 538, 570  
 Parathormon 497, 502  
 Paratiroidă 496, 498  
 Pelagra 98  
 Pentoza 136  
 Pepsina 12, 28, 45, 66, 415  
 Pepsinogen 415  
 Peptide 27, 415, 496  
 Peroxidaze 57, 361  
 Pielea 570  
 Piran 252  
 Piridoxal 101  
 Piridoxalfosfat 101, 102  
 Piridoxamina 99  
 Piridoxina 99  
 Pirimidina 134, 470  
 Piroi 447  
 Piruvat 279, 287  
 — carboxilaza 116  
 — kinaza 42, 57  
 Piine 597  
 Placentă 496  
 Plasmid 144, 200  
 Plasmalogene 342  
 Plămîn 570  
 Polinucleotid 141  
 Polipeptide 415  
 Poliribozomi 191  
 Polizaharide 246, 263  
 Porfina 447, 448  
 Porfinogen 447  
 Porfirii 455, 456  
 Porfiria cutanea 458  
 — eritropoetică 458  
 — variegata 458  
 Porfobinogen 451  
 Portocală 597



Potasiu 596  
 Pregnan 349  
 Pregnenolonă 539  
 Procarboxipeptidaza 416  
 Proelastaza 415  
 Progesteronă 496, 547, 548  
 Proinsulină 525  
 Prolabferment 415  
 Prolactină 551, 554, 556  
 Prolina 16, 22, 38, 120  
 Propionil-CoA 106  
 Prostaciclina 404, 417, 404, 405, 409, 410  
 Prostaglandine 510, 404, 409  
 Proteine 13, 30, 178, 234, 412, 441, 582  
 Proteina G 503  
 Proteoglicani 328  
 Protohem 452  
 Protoporfiria 440, 450, 451, 452  
 Pseudoridina 164  
 Purina 134, 470, 481  
 Puomicina 189  
 Putresceina 420

## R

Renina 415, 544  
 Retinol 118, 121, 123, 350  
 Riboflavina 93  
 Ribonucleaza 28, 31, 57  
 Ribotimidina 164  
 Riboză 136, 435, 474, 480,  
 Ribozom 326  
 Rifampicina 189  
 Rinichi 521, 538, 570  
 Rodilemia 587  
 Rodopsina 122, 504

## S

Salivă 570  
 Salmină 45  
 Sarboză 251  
 Scualen 347, 385  
 Secretină 497, 529, 531  
 Seleniu 605  
 Serina 16, 22, 324, 419, 420, 430, 436,  
 441  
 Serincefaline 340  
 Serotonină 420, 560  
 Serumalbumină 14, 28, 45  
 Sfingolipide 331, 333, 342, 378  
 Sfingomieline 340, 343, 380  
 Sfingozină 378  
 Sindrom Crigler Najjar 463  
 — Dublin-Johnson 464  
 — Lesch-Nyhan 484  
 — Pompe 316  
 — Rotor 464  
 Sistem tampon 578  
 Singe 570, 581, 610  
 Smaltul 570

Sodiul 593  
 Somatomedine 561  
 Somatostatina 527, 529, 551, 524, 530,  
 569  
 Somatotropină 497, 551  
 Sorbitol 258, 260  
 Spectrina 14  
 Spirala Lynen 355  
 Stercobilină 464  
 Stercobilinogen 464  
 Steran 348  
 Steroizi 348  
 Steroli 350  
 Stomac 496  
 Streptomicina 189  
 Substanța P 533, 565  
 Succinat 236, 362  
 Succinil-CoA 111  
 Succinat dehidrogenaza 84  
 Suc gastric 415, 570, 577  
 — intestinal 415  
 — pancreatic 415, 578

## T

Tagatoza 253  
 Talaza 253  
 Taurina 390, 441  
 TDP 470  
 Terpene 345  
 Testicul 496  
 Testosteronă 497, 545, 546, 547  
 Tetraciclina 189  
 Tetraiodotironină 497  
 Tiamina 93, 94  
 Tiaminpirofosfat 91, 94  
 Tiamină 134, 215, 470, 493  
 Timidină 136, 142, 470  
 TMP 473, 493  
 Tiouridină 464  
 Tireoglobulina 45, 193  
 Tireotropină 497, 551, 556  
 Tiroida 496  
 Tiroxina 500, 512  
 Tirozina 16, 22, 154, 415, 420, 535  
 Tirozinaza 57  
 Tocoferol 126, 349  
 Toxina difterică 121  
 Transaminaze 421  
 Transferaze 286  
 Trasferina 14  
 Transpozon 207  
 Treonina 16, 22, 430  
 Treoza 253  
 Trietanolină 421  
 Trigliceride 336, 370, 373, 382, 443, 512,  
 580, 581  
 Triiodotironină 497  
 Tripsină 60, 65, 415, 416  
 Tripsinogen 415  
 Triptamină 424

Triptofan 16, 22, 117, 413, 420, 560  
Trombină 60, 508  
Trombocite 408  
Tromboxani 404, 407, 410  
TRH 508, 551  
TSH-RH 41, 556  
TTP 470

## U

Ubichinona 347  
UDP 470  
UMP 470  
Uracil 134, 470  
Ureaza 50  
Ureca 423, 424, 426, 451  
Uricaza 483  
Uridină 136, 470  
Urina 434, 579  
Urobilină 464  
Urobilinogen 464  
Uroporfirinogen 452  
UTP 151, 300, 470

## V

Valina 15, 22, 207, 259, 426  
Varză 597  
Vasopresina 41, 497, 557  
Vin 581  
Virusuri 166, 565

Vitamine 56, 88, 118  
Vitamina A 118, 125, 348, 604  
— B<sub>1</sub> 90  
— B<sub>2</sub> 93  
— B<sub>6</sub> 99  
— B<sub>12</sub> 95, 107, 111  
— C 115, 120, 430  
— D 122, 123, 494, 521  
— E 127, 346  
— K 128, 188, 346  
— PP 93, 433

## X

Xantină 215, 251, 470, 481, 484  
Xantoame 400  
Xantomatoză 400  
Xantozidă 468  
Xenobiotice 300  
Xiloza 251, 320, 330  
Xiluloza 300  
XDP 469  
XMP 469  
XTP 469

## Z

Zaharoza 226, 262, 266  
Zimogen 82  
Zimosterol 386  
Zinc 608



ISBN 973-39-0114-8  
ISBN 973-39-0141-5

Redactor de carte : Farm. dr. ELENA HAȚIEGANU  
Tehnoredactor : MIHAI ȘTEFANACHE

BUN DE TIPAR : 08.IV.1991.  
FORMATUL : 16/70×100.  
HIRTIE : SCRIS IA 70×100/56.  
COLI DE TIPAR : 38,75.

Tiparul executat : IMPRIMERIA „OLTENIA”  
Bulevardul Ion Antonescu, nr. 102



203094 GEN. LOCAL 1991



ISBN 973-39-0116-4  
ISBN 973-39-0114-8

Lei 280

